

Université 
de Montréal



Faculté de médecine

FIDE SPLENDET ET SCIENTIA

Université de Montréal

**Impacts métaboliques et thérapeutiques de la vitamine A, sous
forme d'acide rétinoïque, dans l'obésité, la résistance à l'insuline
et le diabète de type 2 chez la souris ob/ob**

**Metabolic and Therapeutic Impacts of Vitamin A as Retinoic Acid
on Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes in ob/ob Mice**

**Metabolicae effectus et medicinale, de retinoic acidum
(Vitaminum A), in obesus, insulin resistentia et Type II diabetes
per murium ob / 'ob'**

par

Daniel-Constantin Manolescu, MSc. BSc. (ing), PhD-Cdt

Nutrition

Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

en nutrition

XVI / XII / MMXVI AGD

© Daniel-Constantin MANOLESCU, Nov. 2018

Cette thèse intitulée :

**Impacts métaboliques et thérapeutiques de la vitamine A,
sous forme d'acide rétinoïque, dans l'obésité, la résistance à
l'insuline et le diabète de type 2 chez la souris ob/ob**

Présentée par :

BSc (ing), MSc. **Daniel Constantin Manolescu** PhD. Médecine/Nutrition

a été évaluée par un comité de thèse composé par les personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. Éric Thorin PhD.

Directeur de recherche : Dr. Jean-Louis Chiasson MD.

Directrice de recherche : Dr. Sylvie Mader PhD.

Membre du jury : Dr. Hélène Déglise PhD.

Examinatrice externe: Dr. Corinne Hoesli PhD.

Représentants du doyen: Dr. Daniel Lajeunesse PhD.

Thèse acceptée le 30. Nov. 2018

Notes d'excellence du projet de recherche et du candidat

Institut de Recherche en Santé Canada / Canadian Health Research Institut (IRSC/CIHR)

- Médaille d'Argent Nationale de Recherche IRSC /CHRSF 2012 (first 2%)
- 2 bourses PhD IRSC (Banting et Best 2014 - first 3% et Formation 2013/ 1-er rang).

Fonds de Recherche en Québec Santé (FRQS)

- Bourse PhD FRQS/ 1-er rang (2012, 2013)

Université de Montréal, FESP, Centres de Recherche CRCHUM et CMDO Québec, Canada

- 02.2015 - Sélectionné meilleurs 9 étudiants PhD du Québec en Diabète, Obésité (FRQS/CMDO)
- 3 Bourses PhD CRCHUM (2 Rang/13 cdt -2015, 2 Rang/33 cdt-2012, 1st Rang/45 cdt - 2011)
- J.A. de Sève PhD 2012, excellence PhD 2013-FESP,

Gouvernement du Canada

- Médaille de Diamant de H.M. Queen Elizabeth II/ 2013.

Résumé

Introduction : L'obésité et le diabète de type 2 (T2DM) sont associés à des perturbations des métabolismes énergétiques, de l'insuline et de la vitamine A (ROL-rétinol ; RE-rétinyl esters; AR-acide rétinoïque) ainsi qu'aux maladies cardiovasculaires. La RBP4 (« *retinol binding protein* ») hépatique est le transporteur équimolaire du ROL dans le sérum. Elle est également sécrétée comme adipokine. La RBP4 sérique est augmentée dans l'obésité, la résistance à l'insuline (RI) et le T2DM, mais il n'avait pas été établi si le transport de ROL dans le sang était subséquent augmenté dans ces maladies. Réduire la RBP4 sérique diminue la RI. Le défi est d'éviter une hypovitaminose A, par perte de ROL circulant, associée à la réduction artificielle de son transporteur sanguin, la RBP4. Notre laboratoire avait démontré qu'un traitement à l'AR diminuait le taux sanguin de ROL chez des rats normaux. Les risques d'hypovitaminose A étaient exclus car l'AR est le métabolite actif principal de la vitamine A. Il avait été suggéré que l'AR influence le poids, la RI et le cœur chez divers rongeurs obèses et RI, avec des résultats variables. Il n'existe pas encore de protocole standardisé de traitement à l'AR pour la RI et le T2DM. Les mécanismes sont à l'étude pour l'optimisation des doses, de la durée et des voies d'administration de l'AR. Les variations du ROL et de la RBP4 sériques et tissulaires n'avaient pas été évaluées, dans ces contextes. Il était pertinent de vérifier ces concentrations de ROL et de RBP4 dans un modèle murin obèse et diabétique certifié, peu ou pas étudié pour ces aspects, ainsi que l'effet d'un traitement à petite dose d'AR sur leurs variations en association avec la RI, le T2DM et les possibles améliorations post-traitement.

Hypothèse : Les concentrations sériques du ROL et de la RBP4 sont élevées chez la souris ob/ob, un modèle animal sévèrement obèse et diabétique. Elles s'accompagnent de concentrations tissulaires élevées de ROL et réduites de RBP4. Un traitement à court terme avec une petite dose d'AR diminuera le ROL circulant et subséquent la RBP4 sérique, normalisera leurs taux tissulaires et diminuera la masse adipeuse et le poids corporel. Tous ces effets contribueront à la diminution de la RI, de l'intolérance au glucose et à l'insuline, et de la glycémie. Ces améliorations du métabolisme des rétinoïdes et de l'état diabétique seront associées à des profils tissulaires spécifiques d'expression de gènes du métabolisme de la vitamine A, et à des indices génomiques, histologiques et physiologiques d'amélioration du métabolisme énergétique. Un effet cardioprotecteur direct de l'AR est envisageable également.

Objectifs : Évaluer chez les souris ob/ob l'impact d'un traitement à l'AR sur : **A)** les taux sériques et tissulaires de vitamine A et de RBP4, la glycémie, la RI, l'intolérance au glucose et à l'insuline, le poids corporel et la taille des adipocytes; **B)** l'expression des gènes (mRNA) du métabolisme de la vitamine A dans le gras sous-cutané (SF), le gras viscéral (VF), les muscles (SM) et le foie (LIV); l'expression des gènes PGC1 α et UCP1 impliqués dans le métabolisme énergétique du gras beige/brun (BAT); l'expression des gènes du système protecteur des peptides natriurétiques (NP) et de ceux associés à l'apoptose et à la fibrose des cardiomyocytes; **C)** la morphologie de tissus adipeux SF et VF et musculaire cardiaque (HT).

Méthodes : Seize souris B6.V-Lep/J ob/ob provenant de Jackson Labs USA et certifiées - avec des cages métaboliques et protocoles moteurs – comme étant hypométaboliques, léthargiques, sous-fertiles, hyperphagiques, obèses, RI, intolérantes au glucose et sévèrement hyperglycémiques (≥ 20 mmol/L), âgées de 9 semaines, ont été divisées en deux groupes égaux. Pendant 16 jours, la moitié des souris (n=8) furent traitées par intubage gastrique avec 100 μ g *at*-RA/jour (2 μ g/g poids corporel/jour) dans 100 μ l d'huile de maïs (véhicule), et l'autre moitié (n=8) seulement avec le véhicule, servant ainsi de témoins diabétiques. Des souris de poids normal et en santé (n=5-9) ont servi de témoins sains. Toutes les souris ont reçu la diète standard internationale No.2018 pour les rongeurs de Harlan Teklad-USA, avec une valeur énergétique de 13.7 kJ/g, et un accès à l'eau *ad libitum*. Le poids corporel et la consommation alimentaire furent mesurés et documentés quotidiennement, avec une balance de précision. Les glycémies à jeun (4h) furent mesurées les jours 9 et 16. Les tests de tolérance au glucose (IPGTT) et à l'insuline (IPITT) furent faits par injection intrapéritonéale, les jours 15 et 16. La concentration de la RBP4 dans le sang et dans les gras SF et VF, les SM et le LIV, ainsi que celle des protéines du système NP dans le HT, ont été mesurées par immuno-buvardage (WB). Les taux de vitamine A circulante et tissulaires ont été quantifiés par chromatographie HPLC. Dans ces tissus, l'extraction de l'ARN a été faite par la méthode TRIZOL, et l'expression génique a été évaluée par RTqPCR semi-quantitative. La morphologie tissulaire fut évaluée par colorations et par histologies. Les réflexes moteurs ont été évalués avec des stimuli du protocole standard SHIRPA et un minimum de deux observations directes quotidiennes.

Résultats : Le présent traitement à l'AR fut associé à : **1)** une baisse du poids corporel en conditions d'apports alimentaires et réflexes moteurs semblables aux souris non traitées; **2)** une

baisse des taux sériques de ROL et de RBP4, de la glycémie, de la RI et de l'intolérance au glucose et à l'insuline; **3)** des changements tissu-spécifiques dans l'expression des gènes : a) du métabolisme de la vitamine A; b) du métabolisme énergétique, augmentant les UCP1 et PGC1 α dans SF et VF); c) du système cardio-NP, normalisant les antiapoptotiques, antifibrotiques et les NP; **4)** une normalisation des taux tissulaires de RBP4, de ROL et de RE ; **5)** une réduction de la taille des adipocytes ; **6)** une réduction de la fibrose et de l'apoptose des cardiomyocytes; **7)** une présence accrue d'acides gras polyinsaturés (PUFA) dans les tissus adipeux traitées, documentée par cryoséparation de phases liquide et solide à -20°C; **8)** des histologies évoquant (sous toute réserve) l'angiogenèse et l'autophagie adipocytaires.

Conclusion : Notre traitement à l'AR : **1)** diminue le poids corporel, le ROL et la RBP4 sériques, la glycémie, la RI et l'intolérance au glucose et à l'insuline; **2)** réduit l'expression (mRNA) de l'adipokine RBP4; **3)** module l'expression des gènes du métabolisme de la vitamine A, améliorant son homéostasie; **4)** normalise les taux tissulaires de RBP4 et de vitamine A; **5)** augmente l'expression adipocytaire des UCP1 et PGC1 α , gènes associés au BAT ; **6)** améliore le métabolisme énergétique, réduisant la taille des adipocytes et la masse adipeuse; **7)** induit un effet cardioprotecteur, antiapoptotique et antifibrotique; **8)** est associé à une présence accrue d'acides gras PUFA dans les tissus adipeux de souris traitées à l'AR. Traditionnellement majoritaires dans les gras beiges/bruns, ces UFA suggèrent aussi que l'AR stimule la formation de BAT; **9)** est associé à des structures évoquant l'angiogenèse et l'autophagie dans les tissus adipeux, ce qui suggère (sous réserve d'une vérification approfondie) une contribution à l'augmentation du métabolisme; **10)** démontre que des améliorations de profils cardiométaboliques sont possibles en dehors des voies de signalisation strictement contrôlées par la leptine et/ou par les hormones sexuelles. Bien que bénéfiques pour le métabolisme énergétique, ces hormones sont diminuées chez les patients obèses, RI et diabétiques, avec l'âge et davantage après la ménopause. Ainsi, l'AR suggère des effets antidiabétiques conjugués, lorsque ces hormones restent partiellement fonctionnelles !

Mots-clés : acide rétinoïque, vitamine A, RBP4, résistance à l'insuline, diabète, adipocytes, gras beige, métabolisme énergétique, peptides natriurétiques, fibrose, apoptose, autophagie.

Abstract

Introduction: Obesity and type 2 diabetes (T2DM) are associated with the impaired metabolism of insulin, energy and vitamin A (ROL-retinol; RE-retinyl esters; RA-retinoic acid) and with cardiovascular diseases. Hepatic retinol binding protein (RBP4) is released into the serum at an equimolar ratio to ROL, and is also secreted as an adipokine. Serum RBP4 is elevated in obesity, insulin resistance (IR) and T2DM. However, limited information is available on the rate of vitamin A metabolism in diseases such as diabetes or as to whether vitamin A (ROL) transport is enhanced by the elevation of RBP4 in the serum. Reducing the serum RBP4 level decreases IR; however, it is challenging to avoid depletion in circulating ROL following an artificial reduction in RBP4. Our laboratory has demonstrated that RA treatment reduces serum ROL in normal rats, with no vitamin A depletion effects (given that RA is the most bioactive metabolite of ROL). Others have suggested that RA may have variable impacts on body weight, IR and the heart in some obese and diabetic rodents. A standardized RA treatment protocol for IR and T2DM does not yet exist, as the mechanisms, optimal doses, duration and routes of administration are still under investigation. Furthermore, the serum and tissue ROL and RBP4 concentrations were not investigated under these conditions. It is of high interest to investigate these ROL and RBP4 concentrations in a certified, yet relatively unstudied for retinoid, obese and diabetic mouse model and to determine whether and how treatment with a small dose of RA influences their metabolic rates associated with IR, T2DM and eventual post-treatment improvements in these animals.

Hypothesis: Serum concentrations of ROL and RBP4 are elevated in the *ob/ob* mouse, a certified severely obese and diabetic animal model. The high serum levels of ROL and RBP4 are accompanied by high tissue concentrations of ROL and reduced tissue levels of RBP4. Short-term treatment with a low dose of RA will reduce serum ROL and RBP4, will normalize tissue ROL and RBP4 levels, and will decrease body fat and weight. All of these effects will contribute to lowering IR, glucose and insulin intolerance and blood glucose. These improvements in retinoid metabolism and the diabetic state will be associated with tissue-specific expression profiles for genes involved in vitamin A metabolism, and with genomic, histological and physiological indices of improved energy metabolism. A direct cardioprotective effect of RA may also be observed.

Aims: To evaluate the impact of our RA treatment in *ob/ob* mice on: **A)** serum and tissue levels of vitamin A and RBP4, blood glucose, IR, glucose and insulin intolerance, body weight and fat cell size; **B)** the expression (mRNA) of genes involved in vitamin A metabolism in subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), muscle (SM) and liver (LIV); the expression of the PGC1 α and UCP1 genes, which are involved in the energy metabolism of beige/brown adipose tissue (BAT); the expression of natriuretic peptide (NP) cardioprotective system genes and of those associated with the apoptosis and fibrosis of cardiomyocytes; and **C)** the morphology of SF and VF adipose tissue and of the cardiac muscle (HT).

Methods: Sixteen 9-week-old B6.V-Lep/J *ob/ob* mice were certified by Jackson Labs USA through the use of metabolic cages and motor protocols, to be hypometabolic, lethargic, subfertile, hyperphagic, obese, IR, glucose intolerant and severely hyperglycemic (≥ 20 mmol / L). These mice were divided into two equal groups. For 16 days, half of the mice (n=8) were treated daily by stomach intubation with 100 μ g at-RA/day (2 μ g/g body weight/day) in 100 μ l of corn oil (vehicle), and the other half (n=8) were treated with only the vehicle, thus serving as diabetic controls. Normal and healthy-weight mice (n=5-9) were used as healthy controls. All mice received the international No.2018 standard rodent diet from Harlan Teklad-USA, which has an energy content of 13.7 kJ/g, and access to water *ad libitum*. Body weight and food consumption were monitored daily using a precision scale. Glycaemia was measured after 4 hours of fasting on days 9 and 16. Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTTs) and insulin tolerance tests (IPITTs) were performed on days 15 and 16. The protein concentrations of RBP4 in the blood and in the SF and VF, SM and LIV, as well as protein in the cardiac NP system, were measured by Western blot (WB). Circulating and tissue vitamin A levels were quantified by HPLC. The RNA was extracted from tissue by the TRIZOL method and gene expression (mRNA) was evaluated by semi-quantitative RT-qPCR. Tissue morphologies were evaluated by staining and histology. Motor reflexes were evaluated daily with valid SHIRPA standard protocol stimuli and a minimum of two daily direct observations.

Results: Our RA treatment was associated with: **1)** a decrease in body weight under similar food intake conditions and decreased motor-reflexes compared with untreated mice; **2)** a decrease in serum levels of ROL and RBP4, blood glucose, and IR, as well as of glucose and insulin intolerance; **3)** tissue-specific expression profiles for genes involved in: **a)** vitamin A metabolism, **b)** energy metabolism (increased UCP1 and PGC1 α in SF and VF), **c)** the cardio-NP system (normalized anti-apoptotic, anti-fibrotic and NP); **4)** a normalization of the RBP4, ROL and RE levels in tissues; **5)** a reduction in adipocyte size; **6)** reduced fibrosis and apoptosis of cardiomyocytes; **7)** increased poly unsaturated fatty acids (PUFAs) in the adipose tissue of RA treated mice, documented by cryoseparation of liquid and solid phases at -20°C; and **8)** histology potentially suggesting adipocyte angiogenesis and autophagy.

Conclusion: Our RA treatment: **1)** decreases serum ROL and RBP4 levels, glycaemia and IR; **2)** reduces the expression (mRNA) of the RBP4 adipokine; **3)** modulates the expression of genes involved in vitamin A metabolism, improving its homeostasis; **4)** normalizes tissue RBP4 and vitamin A levels; **5)** increases PGC1 α and UCP1 gene expression, a signature of brown/beige fat; **6)** improves energy metabolism, reducing adipocyte size, fat mass and body weight; **7)** induces cardioprotective, anti-apoptotic and anti-fibrotic effects; **8)** is associated with increased PUFAs presence in the adipose tissue of RA-treated mice, suggesting that RA may stimulate BAT genesis due to typical dominance of PUFAs in beige/brown fat; **9)** is associated with histologic structures indicating angiogenesis and autophagy in fat tissues, suggesting (pending further investigation) a contribution to improved metabolism in these tissues; **10)** clearly demonstrates that in obesity and diabetes, cardio-metabolic improvements are possible out of the signaling pathways strictly controlled by leptin and sexual hormones, known to be beneficial for the energetic metabolism but decreased in men and women with obesity, insulin-resistance, diabetes, and with age (ex: strongly after menopause). An RA treatment conjugated effect is possible when these hormones are partially functional!

Keywords: retinoic acid, vitamin A, RBP4, insulin resistance, diabetes, adipocytes, beige fat, energy metabolism, natriuretic peptides, fibrosis, apoptosis, autophagy.

Table des matières

Résumé.....	iv
Abstract.....	vii
Table des matières.....	x
Liste des tableaux.....	xiv
Listes des figures.....	xv
Liste d'acronymes et abréviations de l'anglais et du français dans la thèse.....	xvii
Remerciements.....	xxii
Avant-propos.....	xxv
PREMIÈRE PARTIE - REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
CHAPITRE 1 – Les rétinoïdes	2
1.1. PRÉSENTATION DE LA VITAMINE A	2
1.1.1. Introduction.....	2
1.2. METABOLISME GENERAL DE LA VITAMINE A.....	4
1.2.1. Sources, apports, besoins et références pour la vitamine A.....	4
1.2.2. Carences, prévention et toxicologie.....	5
1.2.3. Absorption des rétinoïdes	8
1.2.4. Le foie, principal réservoir de vitamine A de l'organisme.....	10
1.2.5. Circulation sanguine de la vitamine A.....	12
1.3. PROTEINES DE TRANSPORT DES RETINOIDES	13
1.3.1. Introduction.....	13
1.3.2. RBP4/RBP, protéine de transport sérique du rétinol et son récepteur STRA6...	15
1.3.3. CRBP 1, 2 et 3, protéines de transport intracellulaire de rétinoïdes	18
1.3.4. CRABP 1 et 2, protéines de transport intracellulaire de l'acide rétinoïque	20
1.4. MÉTABOLISME INTRACELLULAIRE DES RÉTINOÏDES.....	23
1.4.1. Vitamine A sous forme d'acide rétinoïque	23
1.4.1.1. Introduction à l'acide rétinoïque	23
1.4.1.2. Biosynthèse et isomères de l'acide rétinoïque.....	24
1.4.2. Enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide rétinoïque	27
1.4.2.1. Oxydation du ROL en RAL. Déshydrogénases MDR/ADH et SDR/RDH.	27
1.4.2.2. Oxydation du RAL vers l'AR. Aldéhydes déshydrogénases (ALDH)	29

1.4.2.2.1. ALDH1A1 / RALDH1 (RALDH Classe 1 Type 1)	31
1.4.2.2.2. ALDH1A2/ RALDH2 (RALDH Classe 1 Type 2)	31
1.4.2.2.3. ALDH1A3/RALDH3 (RALDH Classe 1 Type 3).....	32
1.4.2.2.4. ALDH8A1/RALDH4 (RALDH Classe 8 Type 4).....	33
1.4.3. Oxydation catabolique de l'AR - Cytochromes CYP26 / Groupe P450	34
1.4.4 RAR et RXR, récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque	35
1.4.5. Fonctionnement des récepteurs nucléaires de l'AR	37
1.4.6. Éléments de réponse aux récepteurs à l'AR (RARE et RXRE)	40
1.4.7. Actions génomiques indirectes et actions non génomiques de l'AR.....	41
1.5. VITAMINE A ; ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET CLINIQUES	42
1.5.1. La vitamine A et le cycle de la vision.....	42
1.5.2. Vitamine A et santé épithéliale	43
1.5.3. Vitamine A, immunité et cancers.....	44
1.5.4. Vitamine A et embryogenèse.....	45
CHAPITRE 2 –La RBP4 dans l'obésité, la RI et le diabète de type 2 – chapitre publié....	46
2.1. Introduction.....	47
2.2. Obésité, résistance à l'insuline et diabète de type 2.....	47
2.3. Aspects métaboliques de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.....	49
2.4 Association entre RBP4, obésité et résistance à l'insuline.....	52
2.4.1 Études expérimentales sur la RBP4 et la résistance à l'insuline	52
2.4.2 Études cliniques; relations RBP4, résistance à l'insuline et diabète de type 2.....	54
2.4.3 RBP4 dans le diabète sucré gestationnel	57
2.4.4 RBP4, obésité et résistance à l'insuline chez les enfants et adolescents	57
2.4.5 La RBP4 dans la néphropathie diabétique	59
2.5. Études sans corrélation entre la RBP4, l'obésité et la résistance à l'insuline	60
2.6. Mécanismes expliquant l'effet de la RBP4 dans la résistance à l'insuline	62
2.7. Essais de gestion de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2	64
CHAPITRE 3 – La vitamine A dans l'obésité et le diabète de type 2	65
3.1. Les rétinoïdes contrôlent la biologie des tissus adipeux.....	65
3.1.1. Apport des rétinoïdes aux tissus adipeux.....	66
3.1.2. Oxydation réversible du ROL en RAL dans les tissus adipeux.....	67

3.1.3. Particularités du RAL dans les tissus adipeux	68
3.1.4. Production d'acide rétinoïque dans les tissus adipeux	68
3.1.5. Protéines de liaison des rétinoïdes (CRBP) dans les tissus adipeux	69
3.1.6. Transporteurs d'acide rétinoïque (CRABP et FABP5) dans les tissus adipeux ..	70
3.2 Vitamine A, tissus adipeux et sensibilité à l'insuline	71
3.3. Vitamine A, tissus adipeux blanc, bruns et beiges.....	73
3.4. Vitamine A et sécrétion de l'insuline	76
3.5 Vitamine A, métabolisme mitochondrial et résistance à l'insuline	77
3.6. Divers impacts de la vitamine A dans l'obésité et le diabète de type 2	77
3.7 Vitamine A, physiologie cardiaque et peptides natriurétiques ANP et BNP	79
DEUXIÈME PARTIE : PROJET, TRAVAUX, MANUSCRITS ET PUBLICATIONS	82
CHAPITRE 4. Projet : L'AR dans le traitement du diabète chez la souris ob/ob	83
4.1. Introduction.....	83
4.2. Raisonnement justificatif (<i>rational</i>).....	85
4.3. Hypothèses	86
4.4. Objectif général.....	87
4.5. Objectifs spécifiques	87
4.6. Présentation comparée, systémique et intégrée de variables	88
4.7. Méthodologie	89
CHAPITRE 5: Article 1; publié <i>Journal of Nutrition</i> ASN 2010	94
All-trans Retinoic Acid Lowers Serum RBP4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice.....	94
CHAPITRE 6: Article 2, <i>abstracts</i> indexes publiés APNM 2012,2015	121
Retinoic Acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy and promotes beige/brown fat characteristics in diabetic mice	121
CHAPITRE 7 : Article 3, publié <i>APNM</i> CNS/ NRC Press, 2014.....	167
All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice	167
CHAPITRE 8 – Discussions et Conclusions.....	204
8.1. Discussion	204

8.2. L'AR diminue le poids corporel, la résistance à l'insuline, la glycémie et les niveaux sériques de ROL et de RBP4 chez les souris ob/ob	204
8.3. L'acide rétinoïque diminue l'obésité et améliore les métabolismes de la vitamine A et énergétique chez la souris diabétique ob/ob	207
8.3.1. L'AR influence les gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, chez les souris ob/ob, de manière tissu spécifique	208
8.3.2. L'acide rétinoïque normalise les taux tissulaires de vitamine A (ROL et RE)	213
8.3.3. L'acide rétinoïque normalise les taux de RBP4 du tissu adipeux et du foie.....	215
8.3.4. L'AR réduit l'hypertrophie adipocytaire dans les tissus adipeux SF et VF	216
8.3.5. L'AR influence deux gènes importants dans la genèse mitochondriale et le métabolisme du gras brun et beige : UCP1 et PGC-1 α	218
8.3.6. L'AR influence la morphologie du tissu adipeux, suggérant des caractéristiques de gras beige et/ou brun	219
8.3.7. L'AR stimule l'accumulation d'acides gras non-saturés dans les tissus adipeux	222
8.3.8. L'AR pourrait influencer l'activité d'autophagie dans les tissus adipeux	224
8.4. La réduction de la résistance à l'insuline par l'AR ; résultante de carrefour entre le métabolisme de la vitamine A et le métabolisme énergétique.....	226
8.5. Le potentiel cardio-protecteur de l'AR chez la souris diabétique <i>ob/ob</i>	227
9. Limites	231
10. Conclusions.....	233
11. Contribution globale à l'avancement des connaissances	236
12. Perspectives, impacts et suggestions de recherche	239
Bibliographie générale	i
Annexes 1. Architecture, concepts de travail et expertises du projet	xxxii
Annexes 2. Publications in folio du projet, attestations et reglementations	xcii
Annexes 3. Notes biographiques, impacts des recherches et recommandations	cxlii

Liste des tableaux

Tableau 1. Fonctions et emplacements des principales protéines de transport des rétinoïdes.22

Tableau 2 : Activités des RALDHs selon les espèces, pour divers substrats de RAL. 30

Tableau 3. Quelques hétéro-dimères communs formés par les RXR 39

Tableau 4 : Dynamique de la vitamine A et RBP4 dans le sang et tissus des souris témoins minces et en santé, ob/ob et ob/ob + RA. Normalisations après le traitement à l'AR. Chiffres compilés des Article 1 (Manolescu et al. 2010) et Article 2 (Manolescu et al 2017) 215

CHAPITRE 6 -Article 2 (*abstracts* indexés publiés, texte global en soumission à *ELSEVIER*)

Tableau 1. Séquences des amorces (RT-PCR) pour les gènes investigués

CHAPITRE 7 -Article 3 (publié)

Tableau 1. Séquences des amorces (RT-PCR) pour les gènes investigués

Listes des figures

Figure 1. Structures chimiques des principaux rétinoïdes	4
Figure 2. Digestion et absorption intestinale de la vitamine A.....	9
Figure 3. Clivage central et excentrique du β -carotène	10
Figure 4. Métabolisme général de la vitamine A ; de l'absorption, aux tissus cibles.....	11
Figure 5. Plusieurs formes de vitamine A sont presentes dans le serum	13
Figure 6. Ligands métaboliques des protéines cellulaires de transport des rétinoïdes.	15
Figure 7. Absorption de ROL du tandem ROL-RBP4 via le récepteur membranaire STRA6	18
Figure 8. Métabolisme intracellulaire de la vitamine A.....	23
Figure 9. Conversions métabolique intracellulaires des rétinoïdes.....	26
Figure 10. Biosynthèse directe et intermédiaire des isomères de l'AR	27
Figure 11. Cyp 26 dans le catabolisme de l'acide rétinoïque	35
Figure 12. Régulation génique par l'AR via les récepteurs RAR, RXR et éléments RARE...37	
Figure 13. Récepteurs à l'AR (RAR et RXR), RARE et transcription génique.....37	
Figure 14. Dimères RAR/RXR, PPAR/RXR et RXR/RXR, et éléments de réponse	39
Figure 15. Cycle visuel des rétinoïdes	43
Figure 17. Le métabolisme des gras brun et beige diffère de celui du gras blanc	75
Figure 18. Les adipocytes brunes sont plus petites que les blanches.....	75
Figure 19. PGC-1 α et UCP1 sont essentiels pour l'acquisition des gras brun et beige.	218
Figure 20. Comparaisons des gras +RA et véhicules vs des gras blanc et brun natifs.	221
Figure 21. L'autophagie est plus présente dans le BAT et elle est stimulée par le froid.....	225

CHAPITRE 5 - Article1 (publié)

Figure 1. Courbes de croissance pour les souris ob/ob non traitées et traitées avec AR

Figure 2. Glycémies à jeun les jours 9 et 16 de traitement avec AR

Figure 3. Courbes de tolérance au glucose (IPGTT) et à l'insuline (IPITT)

Figure 4. Concentrations de RBP4 et ratio ROL/RBP4 sériques

CHAPITRE 6-Article 2 (*abstracts* indexés publiés, texte global en soumission à *ELSEVIER*)

Figure 1. Expression (mRNA) des gènes du métabolisme de la vitamine A dans les tissus

Figure 2. Vitamine A (rétinol ; rétinyl esters) dans les tissus GSC, GV, MS et F

Figure 3. Valeurs de la protéine RBP4 dans les tissus GSC, GV et F

Figure 4. Effet de l'AR sur les gènes PGC1 α ; UCP1 dans le GSC et GV

Figure 5. Effet de l'AR sur la taille des adipocytes dans le GSC et GV

Figure 6. Métabolisme des rétinoïdes (A) et impact sur les adipocytes (B)

CHAPITRE 7 -Article 3 (publié)

Figure 1. Valeurs de la glycémie, du poids corporel, du poids du cœur et leur ratio

Figure 2. Effet de l'AR sur la taille des adipocytes dans le GV

Figure 3. Effet de l'AR sur les enzymes RALDH1 et CYP26A1

Figure 4. Effet de l'AR sur la fibrose et l'apoptose cardiaques

Figure 5. Effet de l'AR sur les protéines : Bcl-x1 (WB) AAP, BCL2 (mRNA) AAP, BAX (mRNA)PAP, BAX/BCL2, pro-caspase-3 (WB) et caspase-3 (WB) PAP

Figure 6. Effet de l'AR sur les protéines : GATA4 (WB+ mRNA), ANP (mRNA), BNP (mRNA), OT (mRNA) et OTR (WB+ mRNA)

Figure 7. Effet de l'AR sur la protéine eNOS (WB)

Figure 8. Modélisation d'action de l'AR et impact sur les adipocytes et le cœur

Liste d'acronymes et abréviations de l'anglais et du français dans la thèse

*Note d'uniformité : Les acronymes et abréviations du français seront explicités en français dans cette liste et accessoirement dans le texte français de la thèse. Les acronymes originaux de l'anglais, ayant notoriété scientifique acquise, surtout dans nos domaines de recherche, seront explicités en anglais et français dans cette liste et « *primo usum* » dans le texte français de la thèse. Pour des raisons d'uniformité il n'y aura pas de **francisation** d'acronymes anglais. Les acronymes anglais seront utilisés pour éviter la confusion afin d'assurer la cohérence avec les articles publiés. Afin d'éviter la redondance, une 3-ème explication des abréviations ne sera pas faite dans les légendes des figures, mais plutôt un renvoi à cette liste globale. Merci !

AAP	Anti-apoptotic / <i>l'antiapoptotique</i>
ADH	Alcohol dehydrogenase / <i>Alcool déshydrogénase</i>
ADN / DNA	Acid Desoxyribonucleic / <i>Acide désoxyribonucléique</i>
ALDH	Aldehyde dehydrogenase / <i>Aldéhyde déshydrogénase</i>
APL	Acute promyelocytary leukemia/ <i>Leucémie aiguë promyélocytaire</i>
ApoA	Apolipoprotein A / <i>Apolipoprotéine de type A</i>
ApoB	Apolipoprotein B / <i>Apolipoprotéine de type B</i>
ACRTN	ApoCarotenal / <i>Apocaroténal</i>
ACRTNA-A	ApoCarotenoic acid / <i>Apo-Acide Carotenoïque</i>
AR	Acide rétinoïque
AGNE	Acides gras non estérifiés
ANP	Atrium natriuretic peptide/ <i>Peptide natriurétique atrial</i>
AMT	Apport maximum tolérable
ANREF	Apports nutritionnels de référence
ANR	Apport nutritionnel recommandé
ARAT	Acyl-CoA retinol acyltransferase / <i>Acyl-CoA : rétinol acyltransphérase</i>
AUC	Area under the curve / <i>Superficie en dessous de la courbe graphique</i>
BAT	Brown adipose tissue / <i>Tissu adipeux brun</i>
BBG	Basal blood glucose / <i>Glycémie à jeun</i>
β-CRTN	β-carotene / <i>β-carotène</i>

BCMO1 (BCO-I)	β -carotene oxygenase 1 / <i>β-carotène oxygénase 1</i>
BCMO2 (BCO-II)	β -carotene oxygenase 2 / <i>β-carotène oxygénase 2</i>
BME	Besoins moyens estimés
BNP	Brain natriuretic peptide / <i>peptide natriurétique B</i>
CIDEA	Cell death activator / <i>Activateur de mort cellulaire</i>
CMA	Chaperon mediated autophagy / <i>Autophagie avec chaperon</i>
CM	Chylomicron / <i>Chylomicron</i>
CMR	Chylomicrons remnants / <i>Restants de chylomicrons</i>
CMTE	Chaine mitochondriale de transport d'électrons
COCHRANE	Research reviews in human health care and policy / <i>revues scientifiques</i>
COX-II (or 2)	Cytochrome oxydase 2 / <i>Cytochrome oxydase 2</i>
CPT	Carnitine palmitoyltransferase / <i>Carnitine palmitoyl-transférase</i>
CYP 26	Cytochrome polypeptide family 26 / <i>Cytochrome polypeptide famille 26</i>
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor / <i>Facteur de transcription en amont du promoteur du gène de l'albumine aviaire</i>
CRABP 1 et 2 (CRABP I et II)	Celular retinoic acid binding protein / <i>Protéine cellulaire de transport de l'acide rétinoïque</i> / (Apo-CRABP, forme libre d'acide rétinoïque)
CRBP 1, 2 et 3 (CRBP I, II et III)	Celular retinoid binding protein / <i>Protéine cellulaire de transport de rétinoïdes RAL et ROL</i> / (Apo-CRBP forme libre de rétinoïdes)
CRAD	Cis-ROL-Androgene-Deshydrogenase / <i>Cis-ROL-A. déshydrogénase</i>
CYP26/P450	Enzyme de la famille du cytochrome P450
DBD	DNA Binding Domaine / <i>Domaine de liaison à l'ADN</i>
DGAT-I	Diacylglycerol-acyltransferase I / <i>Diacylglycérol acyltransferase type I</i>
DR	Direct Repetition / <i>Répétition directe</i>
Fig.	Figure / <i>figure</i>
GMPc	Guanine monophosphate cyclique
HE	Haematoxylin eosin staining / <i>Coloration hématoxyline éosine</i>
holo-CRABP	CRABP, forme liée à l'AR
holo-CRBP	CRBP, forme liée aux rétinoïdes (RAL;ROL)
holo-RBP4	RBP4, forme liée à du ROL
HPLC	High pressure liquid chromatography / <i>Chromatographie phase liquide</i>

HPS	Haematoxylin phloxin safran / <i>Coloration hématoxyline phloxine safran</i>
HSL	Hormone-sensitive lipase / <i>Lipase hormone sensitive</i>
IOM	Institute of Medicine / <i>Institut de médecine</i>
IPGTT	Glucose tolerance test / <i>test de tolérance au glucose</i> (intrapéritonéal)
IPITT	Insulin tolerance test / <i>test de tolérance à l'insuline</i> (intrapéritonéal)
IR	Insulin resistance / <i>résistance à l'insuline</i>
IR	Insulin receptor / <i>récepteur membranaire de l'insuline</i>
IRS	Insulin receptor substrate / <i>substrat du récepteur de l'insuline</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside / <i>idem en français</i>
LBD	Ligand binding domain / <i>domaine de liaison avec le ligand</i>
LDL	Low density lipo-protein / <i>lipoprotéine de basse densité</i>
LIV	Liver / <i>foie</i>
LPL	Lipo-protein lipase / <i>lipoprotéine lipase</i>
LPLB	Lipo-protein lipase B / <i>lipoprotéine lipase B</i>
LPT	Pancreatic lipase / <i>Lipase pancréatique</i>
LRAT	Lecitin; retinol acid transferase / <i>lécithine; rétinol acide transférase</i>
MDR	Mid dehydrogenase reductase / <i>réductase à chaîne moyenne</i>
MTP	Microsomal triglyceride transfert protein / <i>protéine de transfert microsomial de triglycéride</i>
NAD	Nicotinamid adenin dinucleotide oxidized / <i>nicotinamide adénine dinucléotide oxydé</i>
NAD⁺	NAD derived oxidation agent / <i>agent d'oxydation dérivé de NAD</i>
NADH	NAD derived reduction agent / <i>agent de réduction dérivé de NAD</i>
NADP	NAD phosphate / <i>idem en français</i>
NADP⁺	NADP derived oxidation agent / <i>agent d'oxydation dérivé de NADP</i>
NADPH	NADP derived reduction agent / <i>agent de réduction dérivé de NADP</i>
Normalisation	Tendance vers la normalité
NP	Natriuretic peptides (ANP; BNP) / <i>peptides natriurétiques (ANP; BNP)</i>
NPR-A;B	Natriuretic peptides receptors A; B / <i>récepteurs peptides natriurétiques</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
OPM	Oxidate polar metabolites / <i>métabolites polaires oxydés</i>

PAP	Pro-Apoptotic / <i>Pro-Apoptotique</i>
PL	Phospholipids / <i>Phospholipides</i>
PTL	Pancreatic triglyceride lipase / <i>triglycérides-lipase pancréatique</i>
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α / <i>idem</i>
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor / <i>récepteur de peroxysomes</i>
PKG	G protein kinase / <i>protéine kinase dépendante du GMPc (PK-G)</i>
RA	Retinoic acid / <i>acide rétinoïque</i>
RE	Retinyl esters / <i>esters de rétinol ou rétinyl esters</i>
RAL	Retinal / <i>rétinal</i>
ROL	Retinol / <i>rétinol</i>
RALDH	Retinaldehyde deshydrogenase / <i>rétinaldéhyde déshydrogénase</i>
RAR	Retinoic acid receptor / <i>récepteur pour l'acide rétinoïque</i>
RARE	Retinoic acid response element / <i>élément de réponse à l'acide rétinoïque</i>
RBP /RBP4	Retinol binding protein / <i>transporteur plasmatique de ROL (apo-RBP4 = sans ROL; holo-RBP4 = avec ROL)</i>
RDH	Retinol deshydrogenase / <i>rétinol déshydrogénase</i>
REH	Retinyl-ester hydrolase/ <i>hydrolase pour esters de rétinol</i>
mRNA	Messenger ribonucleic acid / <i>acide ribonucléique messenger</i>
RODH	Retinol deshydrogénase-reductase / <i>rétinol déshydrogénase-réductase</i>
RPE	Retinal pigment epithelium / <i>épithélium pigmentaire rétinien</i>
RXR	Retinoic acid X receptor / <i>récepteur nucléaire X pour acide rétinoïque</i>
SDR	Short chain deshydrogenase-reductase/déshydrogénase-réductase courte
SF	Subcutaneous fat / <i>gras sous-cutané</i>
SM	Skeletal muscle / <i>muscle squelettique</i>
SNP	Single nucleotide polymorphism / <i>polymorphisme mono-nucléotidique</i>
STRA6	Stimulated by RA receptor 6 / <i>récepteur membranaire du ROL-RBP4</i>
TAPTL	Triacylglycerol pancreatic lipase / <i>triacylglycerol lipase pancréatique</i>
TG	Triglycerides / <i>triglycérides</i>
TR	Thyroid receptor / <i>récepteur de l'hormone thyroïdienne (nucléaire)</i>
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
TTR	Transthyretin / <i>Transthyrétine</i>

T2DM	Type 2 diabetes mellitus / <i>diabète de type 2 (sucré)</i>
UNICEF	United Nations Infants and Children Foundation / <i>ONU pour l'enfance</i>
UCP1	Uncoupling protein 1 / <i>protéine de découplage mitochondrial no. 1</i>
VADD	Vitamin A deficiency disturbance / <i>perturbations de carence en vit. A</i>
VAD	Vitamin A deficiency / <i>déficiences sous-cliniques de vitamine A</i>
VDR	Vitamin D receptor / <i>récepteur de la vitamine D (nucléaire)</i>
VF	Visceral fat / <i>gras viscéral</i>
VLDL	Very low density lipoprotein / <i>Lipoprotéine de très basse densité</i>
WAT	White adipose tissue / <i>tissu adipeux blanc</i>
WB	Western Blot immune-detection / <i>immuno-buvardage de type Western</i>

Remerciements

Merci, à ceux qui m'ont aidé durant les recherches de cette Thèse de Doctorat PhD et tout particulièrement à mon épouse Dre. Aurélia Sima Manolescu / MSc. Nutrition-Ing. Chimie alimentaire et à ma fille Drd. Amélia Irina Manolescu / MSc. Linguistique, pour leur amour et soutien. A nos amis félins Gandalf, Cous, Suzi, Sam et Sunny pour leur amour inconditionnel. Merci à mes directeurs de thèse Dr Pangala V. Bhat et Dr. Jean-Louis Chiasson. Un merci spécial pour Dr Sylvie Mader ma directrice de thèse et modèle de rôle comme chercheuse scientifique, sans qui pleins des choses n'auraient pu naître. Une pensée spéciale pour Dr Daniel Lajeunesse, Dr Hélène Delisle, Dr. Tony Leroux, Dr Yolanta Gutkowska, Dr Ryszard Grygorczyk et MSc. Sylvie Oble. Remerciements aussi à Dre. Irène Strychar Rasio, Dr Eugenio Rasio, Dr Jean-Claude Lavoie, MSc Rafaela Vicaretti, Dre. Valerie Marcil, Dr Olivier Receveur, Dr Christine Des Rosiers et Dr Lise Coderre, pour leur foi constante en mes capacités. Merci à Mme. Marie-Noël Nuret et Mr. Martin Lehberger, pour leur précieux accueil et soutien dans l'adversité. Remerciements aux pères Charles Granche, Robert Gendreau et Thomas Gomes-c.s.c. pour leur accueil, soutien moral et réconfort spirituel. Je les prie ainsi d'être mes intermédiaires auprès de Dieu pour y transmettre toute ma gratitude pour Ses Grâces. Remerciements à mon coach scientifique au Baccalauréat de Sciences et Techniques Alimentaires, Dr George Vasilescu, le directeur de mon premier PhD, roumain. Merci aux associations étudiantes FAÉCUM et au syndicat étudiant SÉSUM pour leur soutien actif à éliminer des impaires administratifs. A mes parents Manolescu Constantin et Elena, à mes amis(es), Bilbo, Sunny, à mes professeurs et mes collègues, qui ont cru en mon potentiel.

Daniel Constantin Manolescu

Montréal, Québec, Canada

19. XII.2016 Canada

A.D. MMXVII - MMXVIII

Avec tout mon amour, à ma famille, mon épouse Aurélia Sima Manolescu, ma fille Amélia Irina Manolescu et à nos amis et fidèles compagnons félins Gandalf, Suzie, Couss et Sam. A mes parents Constantin et Elena Manolescu dans le Ciel.

Daniel Constantin Manolescu



PER ASPERA AD ASTRA IN HOC SIGNO VINCES



AUDACES GRATIA ADJUVAT

Remerciements à nos comités d'experts scientifiques et linguistiques

1) Révision du Français :

- Mr. Marc Paré - professeur de français, traducteur-reviseur agréé, Impact J. Média,
- Mr. Gilles Larose - traducteur-reviseur agréé, Diocèse de Montréal
- Mr. Jean Dussault - professeur de français, traducteur-reviseur agréé
- MSc. Amélia Irina Manolescu, PhD-Cdt. Linguistique - Université de Montréal
- Notre comité de thèse PhD

2) Révision de l'Anglais :

- Révisions linguistiques ELSEVIER- Editions scientifiques internationales.
- MSc. Amélia Irina Manolescu, PhD-Cdt. - Université de Montréal

3) Expertises spécifiques en rétinoides dans l'obésité, résistance à l'insuline et diabète :

- Dr. Luisa Bonet – University of Balear Islands, Spain, Union européenne (UE)
- Dr. Andreu Palou – University of Balear Islands, Spain, UE
- Dr. Pangala V Bhat – Université de Montréal, Québec, Canada
- Comités d'experts des Fonds de Recherche Scientifique Québec–FRSQ
- Comités d'experts des Canadian Health Research Institutes – CIHR/IRSC

4) Consultants en méthodologie et en rédaction scientifiques :

- Bureau de formation *ELSEVIER* – Editions scientifiques internationales.
- Dr. Pangala V Bhat – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Muhammad Zafarullah – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Ryszard Grzegorzczak – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Paul Goodyear – Université McGill, Québec, Canada
- Dr. Olivier Receveur – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Irene Strychar – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Eugenio Rasio – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Chantal Bemeur – Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Eugen Vasilescu – Université de Galati, Roumanie, UE
- Comités d'experts des Fonds de Recherche Scientifique Québec–FRSQ
- Comités d'experts des Canadian Health Research Institutes – CIHR/IRSC
- Notre comité de thèse PhD

5) Pédagogie et présentations académiques:

- Dr. Doreen Stark-Meyerring, Prof. Rhétorique Scientifique - Université McGill
- Dr. Pangala V Bhat - Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Olivier Receveur - Université de Montréal, Québec, Canada
- Dr. Christine Des Rosiers - Université de Montréal, Québec, Canada

6) Droits d'auteur et propriété intellectuelle :

- *ELSEVIER* – Editions scientifiques internationales.
- *FESP*-Règlements de la propriété intellectuelle - Université de Montréal, QC, Canada
- Mr. Martin Lehberger –Edition, diffusion et distribution, Soleils/Desiris – France, UE

Avant-propos

L'obésité, le syndrome métabolique (SM) et le diabète de type 2 (T2DM), sont des troubles métaboliques qui augmentent de façon épidémique. La résistance à l'insuline (RI), la sécrétion d'insuline perturbée, la dyslipidémie, l'intolérance au glucose, les stéatoses hépatiques et l'athérosclérose apparaissent dans l'une ou plusieurs de ces pathologies. En dépit de nombreuses recherches, il n'y a pas de guérison pour ces états. Plusieurs investigations chez les rongeurs et les humains ont démontré une association entre les taux de la protéine sérique de transport de rétinol (RBP4 « *retinol binding protein* »), l'obésité, la RI et le diabète. Il a été démontré que les taux sanguins de RBP4 sont élevés chez des souris insulino-résistantes, et que leur réduction s'accompagne d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Yang et al. 2005). Chez l'humain, les hautes concentrations sanguines de RBP4, sont également associées à de l'insulino-résistance chez des patients obèses, intolérants au glucose, diabétiques de type 2 ou encore ayant une forte histoire familiale de T2DM (Graham TE et al. 2006b). De plus, une RBP4 sérique augmentée est aussi associée à plusieurs composantes augmentées du syndrome métabolique tels que : l'obésité, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle (Klötting et al. 2007).

Les taux élevés de la RBP4 circulante chez les souris et les humains obèses et résistants à l'insuline suggèrent que le métabolisme des rétinoïdes pourrait aussi être perturbé dans ces conditions. Toutefois, peu d'informations existaient sur le métabolisme et les taux circulants et tissulaires de vitamine A dans l'obésité, la RI et le diabète. Malgré des concentrations sériques des précurseurs RE (« *retinyl-esters* ») rapportées élevées chez les obèses diabétiques (Wako et al. 1986), il n'était pas clair si le métabolisme du rétinol (ROL) était affecté à son tour. Pas clair non plus pour l'impact du métabolite subséquent du ROL, l'acide rétinoïque (AR), qui est actif par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires RAR et RXR (Chambon P. 1996). Car même si l'AR est un agent métabolique thérapeutique anticancéreux démontré (Freemantle et al. 2003, Petkovich PM 2001), son efficacité dans d'autres troubles métaboliques comme la RI et le diabète demeure incomprise, étant insuffisamment explorée. Notre laboratoire avait observé qu'un traitement à l'AR diminue les niveaux circulants de ROL chez des rats normaux (Bhat and Lacroix 1991a, Keilson et al. 1979), (Bhat Lacroix 1986). L'AR étant le métabolite actif de la vitamine A, par excellence, aucun risque d'avitaminose A n'était encouru. Même si la RBP4 sérique n'a pas été mesurée, dans nos études préalables, il est possible qu'elle ait été aussi diminuée, parce que le ROL circule dans le sang lié au RBP4, étant libérés de façon équimolaire par le foie. Nous nous sommes dit qu'advenant une diminution de RBP4 sérique suite aux traitements avec de l'AR, mais cette fois chez des animaux obèses et diabétiques, alors elle devrait s'accompagner d'une baisse de la RI aussi. Il n'était pas clair si le transport sanguin de ROL est aussi augmenté, suite à l'augmentation du taux sanguin de RBP4 par l'obésité, la RI et le diabète.

L'objectif général de ce projet de recherche est d'évaluer la capacité de l'AR d'abaisser le taux sanguin de RBP4, et d'améliorer le profil cardiométabolique chez les souris ob/ob, un modèle animal validé, que nous avons choisi parce qu'obèse, hyperphagique, sédentaire, avec

un métabolisme de base réduit, résistant à l'insuline et diabétique, mais pas carencé en vitamine A (ROL, RE). Au Canada il y a abondance alimentaire de rétinoïdes, donc nous n'explorons pas le rôle de carences alimentaires de vitamine A dans l'obésité bien que, dans des pays en développement, l'apport alimentaire pauvre en vitamine A soit associé à l'obésité et au diabète, en contexte de double fardeau de malnutrition. Parmi les objectifs spécifiques, par articles, nous avons également ciblé l'évaluation des effets de l'AR sur : **1)** la RBP4, la sensibilité à l'insuline et le ROL circulant; **2)** des phénotypes génomiques, anatomiques et physiologiques impliqués dans le métabolisme de la vitamine A (rétinoïdes) et dans le métabolisme énergétique en association avec les taux sanguin et tissulaires de ROL, RE et RBP4, dans le diabète et après son amélioration post-AR ;**3)** les systèmes cardioprotecteurs de l'ocytocine-peptides natriurétiques (OT-NP). Nous expliquons ces aspects *in extenso* dans le chapitre 4. Il était intéressant de mesurer les concentrations de vitamine A et de RBP4 dans le sérum et les tissus de souris ob/ob et d'observer comment le diabète et notre traitement, avec une petite quantité d'AR (2µg/g/pc/j), affectent l'homéostasie de la vitamine A et les profils tissulaires d'expression des gènes de son métabolisme, en parallèle avec la sensibilité à l'insuline. De façon complémentaire, puisque cela n'avait pas encore été fait, dans ce montage contextuel, nous avons voulu vérifier quels effets l'administration d'AR, aura sur l'appétit, les réflexes moteurs, le poids corporel, la morphologie et la plasticité des tissus adipeux (sous-cutané, viscéral), en tant qu'indices d'impact sur le métabolisme. Nous démontrons également la capacité de l'AR à améliorer les systèmes cardioprotecteurs de l'ocytocine-peptides natriurétiques (OT-NP) et eNOS, systèmes associés à la survie cellulaire et à la prévention du remodelage cardiaque anormal. Nous présentons pour la première fois une évidence que l'acide rétinoïque prévient l'apoptose et la fibrose des cardiomyocytes via une régulation émanant du système ocytocine-BNP. Depuis le début de notre projet (2008), nous sommes les seuls à avoir étudié ces aspects contextuels. Suite à nos premières résultats (Manolescu et al.2010), la revue britannique « Lead Discovery » déclarait en 2011 nos travaux « de grand intérêt et potentiel pharmaceutique thérapeutique », alors qu'une prestigieuse revue de littérature espagnole spécialisée en rétinoïdes, obésité et diabète nous incluait parmi les 10 équipes pionnières du domaine au monde (Bonet L et al 2012). Nos recherches ont déjà conduit à des études cliniques sur l'implication des rétinoïdes dans le diabète de type 2 (Sima A. 2017) et préparent de futurs traitements à l'AR chez l'humain.

Les trois articles de recherche de cette thèse sont publiés avec comités des pairs, dont deux intégralement (no.1/2010 et no.3/ 2014) et des données du no.2 comme *Abstracts* indexés dans *Diabetes en Metabolism* et *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism-CNS* en 2012, 2013 et 2015, pour valider nos résultats intermédiaires. Le chapitre 2 sur la RBP4 de la revue de littérature a été publié aussi, en 2014. Depuis, nos travaux ont été cités (https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu/citations) par plus de 60 équipes au monde, dans leurs publications (dont 53 pour l'article 1, et 9 pour l'article 3), qui confirment nos méthodes, résultats et contributions. Nous offrons donc une thèse avec quatre (4) publications. Pour ne pas avoir à revalider nos méthodes, nous avons employé des techniques largement connues, utilisées depuis longtemps et déjà standardisées dans la littérature, et les

avons souvent utilisées en double sous-traitance par des laboratoires certifiés. Six (6) autres projets de recherche impliquant l'acide rétinolique (AR) dans l'obésité et le diabète ont été ajoutés en Perspectives et Annexes. Parmi elles: trois projets de recherche fondamentale (dont pour le premier l'article de revue au complet), un projet clinique vétérinaire et deux projets cliniques humaines complets. Obéissant aux engagements signés avec les Instituts de Recherche Scientifiques du Canada (IRSC) et les Fonds de Recherche Québec Santé (FRQS), nous incluons leurs évaluations qui ont validé et financé notre présent projet de doctorat PhD, parmi les premières dans ses catégories au pays : 1^{er} au Québec, 1^{er} 2,93 % (25/852) Banting et Best, au Canada. Leurs notes d'évaluations de qualité et intérêt scientifique du projet de notre thèse, sont les mêmes que celles de la FESP de l'Université de Montréal (ex.: clarté de la problématique, concordance des hypothèses et objectifs, pertinence des méthodes et analyses, originalité du projet et contribution à l'avancement des connaissances) et nous vous les offrons dans une optique de transparence.

Par des aléas hors de notre contrôle, trois directeurs ont été impliqués dans nos recherches, commençant avec le Dr P.V. Bhat (retraité en 2014). Par ailleurs ceci est notre deuxième PhD (le premier fut réalisé en Roumanie). Nous souscrivons à la pédagogie latine éprouvée de trois rappels : « *Repetitio mater studiorum est* » ! Nous avons uniformisé les citations et donné des preuves légales de conformité avec les droits d'auteur. Nous prouvons l'inutilité de remesurer des acquis scientifiques (ex. 9kcal/g gras; le non-contrôle de réflexes innés). Nous avons annexé nos diplômes, certifications et expertises (ex. : B.Sc.ing Chimie alimentaire, M.Sc. Nutrition, Pédagogie et éducation scientifique, éthique, droits d'auteur, kinésiologie, comités pré-doc et parrainage scientifique, Agence spatiale canadienne, anglais).

Droits d'auteur

La diffusion de cette thèse de doctorat Ph.D. se fait dans le respect des droits de son auteur, et selon l'autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs (FESP-Université de Montréal). Cette autorisation stipule que nous (l'auteur) concédons à l'Université de Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de notre travail de recherche, pour des fins pédagogiques et non commerciales. Nous (l'auteur) autorisons l'Université de Montréal à reproduire, diffuser ou prêter des copies de notre travail de recherche à des fins non commerciales sur divers supports médias et sous conditions de citation et référencement explicites. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente écrite contraire, l'auteur conserve entièrement la liberté de promouvoir, diffuser, valoriser et commercialiser ce travail et ses produits dérivés, de quelque nature ou manière que ce soit.

Daniel Constantin Manolescu- BSc. (ing), MSc, PhD.

PREMIÈRE PARTIE - REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 – Les rétinoïdes

1.1. PRÉSENTATION DE LA VITAMINE A

1.1.1. Introduction

La vitamine A-rétinol (ROL) est une vitamine lipophile, hydrophobe, solide à la température ambiante, avec une masse moléculaire de 286,5 Da. On trouve de la vitamine A dans divers produits alimentaires. La vitamine A fut initialement découverte en 1913 par les chercheurs McCollum, Davis, Osborne et Mendel. Ces chercheurs ont remarqué que des rats nourris seulement avec du lard développent diverses infections et affections oculaires, avec baisse et même perte complète de la vision nocturne, qui disparaissent lors de l'ajout de beurre ou de jaune d'œuf. Ils ont postulé l'existence d'un élément essentiel dans les corps gras, qu'ils ont appelé « substance liposoluble A » (« *the fat-soluble A* »). L'équipe suisse du Dr Paul Karrer a isolé cette substance active en 1931 dans l'huile de poissons marins et identifié sa formule chimique comme étant $C_{20}H_{29}OH$, avec une masse molaire de 286,5g/mol, dont C : 83,86 %, H : 10,56 % et O : 5,59 %. Dans le foie des poissons d'eau douce, il existe aussi une forme de ROL déshydrogéné ($C_{20}H_{27}OH$), possédant seulement 40% de l'activité du ROL. La structure chimique brute du ROL est illustrée dans la Figure 1. Chaque rétinoïde contient dans sa formule un anneau aromatique de β -ionone, un groupement isoprénoïde, et un composé polaire à la fin. Le composé final, est soit hydroxyle (HC-OH) pour le rétinol (ROL), soit aldéhyde (HC = O) pour le rétinol (RAL), soit carboxyle (HO-C = O) pour l'acide rétinoïque (AR). La vitamine A se trouve dans le corps sous ces trois formes qui sont biochimiquement actives, plus une réserve sous forme de rétinyl esters (RE). La dénomination générique de vitamine A définit le ROL ainsi que les dérivés rétinoïdes. Les rétinoïdes se dégradent facilement sous l'influence de l'oxygène, de la lumière et de la température. La vitamine A se trouve dans les végétaux sous forme de caroténoïdes (ex. β -carotènes), alors que dans les aliments de provenance animale elle se trouve sous forme de RE (le foie étant l'organe de réserve des RE). Les deux formes peuvent être converties en ROL dans le corps. La vitamine A est importante pour la vision, la reproduction, l'organogenèse, la croissance, l'immunité, l'intégrité tégumentaire et le métabolisme énergétique (Blomhoff 1994, De Luca L.M. 1991, Dowling and Wald 1960, Moore 1959, Thompson et al. 1964). N'ayant pas la capacité biologique de synthétiser la vitamine A par eux-mêmes, les humains et les animaux doivent se la procurer par leur alimentation de

provenance animale (RE) ou végétale (β - et autres carotènes). Le RAL est essentiel dans le processus de la vue, alors que l'AR est un ligand pour ses récepteurs nucléaires RAR et RXR, contrôlant ainsi l'expression de plusieurs gènes (Blomhoff and Blomhoff 2006). Différents isomères existent pour chaque forme de vitamine A (ROL, RAL, AR) et il existe trois isoformes d'AR pouvant activer les récepteurs nucléaires RAR et RXR, soit les *all-trans*, *9-cis* et le 3, 4-didehydro RA (Leid et al. 1992). Les isomères ont une orientation *cis*- ou *trans*- du morceau isoprénoïde (Figure 1). L'homéostasie de la vitamine A est très importante, et l'hypervitaminose ou l'hypovitaminose sont également nocives, puisque cette vitamine contrôle plusieurs métabolismes et processus biologiques (Bhat and Manolescu 2008, Ziouzenkova O and Plutzky 2008). En effet, les rétinoïdes sont impliqués dans plusieurs pathologies relevant de l'ophtalmologie, de la dermatologie, de l'oncologie et de l'endocrinologie (ex.: obésité, diabète) (Abu et al. 2005, de Botton et al. 2005). L'acide rétinoïque est un agent thérapeutique pour l'acné et de façon complémentaire dans la leucémie myéloïde. Des études sur les animaux ont démontré des liens clairs entre le métabolisme de la vitamine A, l'adipogenèse et la biologie des tissus adipeux (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Manolescu et al. 2010). La vitamine A est active dans plusieurs tissus tels que : le tissu intestinal, les tissus adipeux blanc (WAT) et brun (BAT), les muscles, le cœur et le foie. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer ses impacts spécifiques dans ces tissus, ainsi que les liens entre le métabolisme des rétinoïdes, l'obésité et le diabète de type 2 (Frey and Vogel 2011). L'acide rétinoïque est aussi impliqué dans l'homéostasie du glucose, la dépense énergétique et l'adipogenèse (Berry et al. 2012b). D'autres études ont démontré que la RBP4 (connue comme transporteur sérique du ROL lorsque sécrétée par le foie, et également comme adipokine sécrétée par le tissu adipeux), est impliquée dans l'apparition de la résistance à l'insuline (Yang et al. 2005). Le potentiel thérapeutique de l'AR dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 est activement à l'étude. Nous présentons dans cette thèse une description de ce que nous avons trouvé dans ce domaine, contribution publiée et reconnue, depuis 2009, parmi les pionniers dans ce domaine (Bonet et al. 2012, Manolescu et al. 2010, 2012, 2013, 2014, 2015 et 2017).

1.2. METABOLISME GENERAL DE LA VITAMINE A

1.2.1. Sources, apports, besoins et références pour la vitamine A

Il est estimé que les herbivores combinent leurs besoins en vitamine A à partir d'une riche panoplie de caroténoïdes (α -carotène, β -carotène, cryptoxanthine, zéaxanthine, lutéine, lycopène). Les caroténoïdes sont des pigments naturels, et les fruits et légumes colorés en contiennent beaucoup. Pour leur part, les carnivores combinent leurs besoins en vitamine A, à partir de la viande de leurs proies qui contient des rétinyl esters (RE-vitamine A préformée), un peu de ROL et de RAL et très peu d'AR (Figure 1) (Fraser and Bramley 2004, O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Autant les RE que les divers caroténoïdes sont des précurseurs de ROL (Gottesman ME et al. 2001a, Nagao 2004).

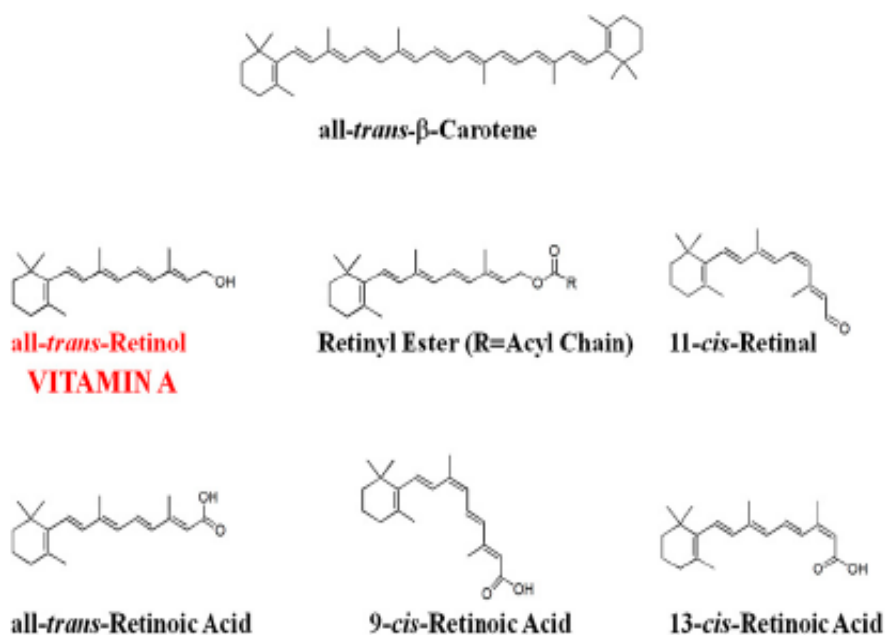


Figure 1. Structures chimiques des principaux rétinoïdes

(O'Byrne S.M. et al. 2013, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, en conformité avec la FESP-Université de Montréal: liste globale d'acronymes disponible en début de la thèse)

Pour comparer l'activité biologique de rétinoïdes sous diverses formes de la vitamine A, une unité de base (soit le rétinol-équivalent) a été établie par convention internationale. Il s'agit de l'unité internationale (UI) de vitamine A, qui correspond à 0,3 μ g de rétinol. Dans le même but, on utilise également la notion d'Équivalent d'Activité de Rétinol (RAE) qui représente, selon les sources alimentaires: 1 μ g de vitamine A préformée (RE), 12 μ g de β -carotène ou encore 24 μ g

d'autres caroténoïdes provitamines A (Trumbo et al. 2001). Les apports nutritionnels de référence (ANREF) pour la vitamine A tiennent compte des pertes (0,5%/jour), de la demi-vie moyenne (141 jours) et des réserves minimales dans le foie (20µg/g foie) pour faire face aux besoins accrus (*Institute of Medicine IOM 2001, USA*). Les besoins moyens estimés (BME) sont de 625µg/jour pour les hommes et 500 µg/jour pour les femmes. Il existe également un Apport Nutritionnel Recommandé (ANR) de 900 µg/jour pour les hommes et 700 µg/jour pour les femmes. L'Apport Maximum Tolérable (AMT) est quant à lui, d'environ 3000 µg/jour de vitamine A préformée (Santé Canada 2012). Pour répondre à ces besoins, et tenant compte de l'importance de la vitamine A pour la santé publique, il est d'usage, dans les pays industrialisés, de procéder à l'enrichissement industriel en vitamine A de produits alimentaires (lait, produits laitiers et dérivés). Dans l'ensemble, 40-70% des apports alimentaires en vitamine A proviennent de la vitamine A préformée (RE ; ROL) et approximativement 30% viennent de divers caroténoïdes (Harrison 2005). Il existe également des recommandations d'apport en vitamine A par jour selon l'âge, soit : enfants : ≤ 1 an/400-500µg, 1-3 ans/300µg, 4-8ans/400µg, 9-13ans/ 600µg ; adolescents et adultes: homme ≥ 14 ans/900 µg, femme ≥ 10 ans/700 µg (Santé Canada 2012). Chez les sujets en santé, la rétinolémie normale augmente légèrement durant l'enfance et l'adolescence, se stabilisant à l'âge adulte (1-6 ans : 0.70 à 1.50 mmol/l ; 7-12 ans 0.90 à 1.70 mmol/l ; 13-19 ans 0.90 à 2.50 mmol/l ; adultes 1.05 à 2.80 mmol/l), (OMS, Santé Canada 2012).

1.2.2 Carences, prévention et toxicologie

Les carences en vitamine A affectent grandement la vision et la santé en général, représentant une cause majeure de handicaps et de mortalité. On parle de carence lorsque la rétinolémie descend en bas de 0,35 µmol/l, ce qui indique l'épuisement des réserves hépatiques (OMS 2011, 2012). Les groupes les plus à risque sont : les femmes enceintes et/ou allaitantes, les prématurés, les nourrissons, les enfants, les adolescents, les alcooliques, les malades chroniques - surtout sur axe digestif - et les populations faisant face à des malnutritions diverses. Le taux de ROL plus bas chez les prématurés semble tributaire d'un défaut de maturation dans la synthèse de son transporteur hépatique. Malgré les efforts pour contrecarrer ces carences, les désordres reliés aux déficits de la vitamine A (VADD, *vitamin A deficiency disturbance*) restent un problème mondial de santé publique. Selon les données de l'Organisation mondiale de la

Santé (OMS-2009; 2011; 2012), de l'UNICEF-2007; 2012 et de COCHRANE-2011, 140 millions d'enfants d'âge préscolaire et plus de 7 millions de femmes enceintes sont affectés annuellement par divers VADD. Près de 4,5 millions d'enfants et 6 millions de femmes souffrent de xérophtalmie (OMS 2013-*Vision 2020 Program*). On dénombre également près de 3 millions de décès d'enfants reliés aux VADD, chaque année (UNICEF, OMS 2012). De plus, 250 millions d'enfants de moins de 6 ans souffriraient de déficiences sous-cliniques de vitamine A (VAD, *vitamin A deficiency*), dont l'immense majorité dans les pays pauvres de l'Asie et en Afrique subsaharienne (UNICEF 2012, OMS 2012). Selon ces organisations, les VAD commencent lorsque les réserves de vitamine A dans le foie descendent en bas de 20 µg/g, même si momentanément la concentration normale (~2 µmol/L) de ROL dans le sang n'est pas affectée (OMS 2001). Si la baisse continue, le taux de ROL circulant descend à satisfaisant (0,70-1,75 µmol/L), ensuite à des concentrations sériques marginales-faibles (10-20 µg/100 ml, 0,35-0,70 µmol/l) pour devenir insuffisant (< 10 µg/100 ml, < 0,35 µmol/l) avec carence et épuisement hépatiques (OMS 2011). Diverses perturbations physiologiques suivent (anémie, baisse du système immunitaire) et des signes cliniques affectant d'abord la vue, comme la xérophtalmie (Gilbert C., *International Center for Eye Health* 2013). Les difficultés d'adaptation à la lumière crépusculaire et de vision nocturne sont parmi les premiers signes de carence clinique de la vitamine A, car le cycle visuel chez les vertébrés dépend de cette vitamine (Baehr et al, 2003). Les carences sévères de vitamine A mènent à des dégénérescences spécifiques (taches de Bitot), à la xérophtalmie avec des kératinisations et ulcères de la conjonctive et de la cornée, et ensuite à l'aveuglement (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les carences d'apport et les dysfonctions du métabolisme de la vitamine A affectent aussi la santé épithéliale, l'embryogenèse et la croissance, l'immunité et le métabolisme en général avec l'augmentation de la prévalence des maladies infectieuses, des cancers, de l'obésité, du diabète et de plusieurs autres maladies chroniques (Blomhoff and Blomhoff 2006). Nous avons développé ces sujets physiologiques et cliniques plus loin, avec accent sur la RBP4 et le ROL dans l'obésité et le diabète, dans les chapitres 2 et 3.

Depuis 1997, pour corriger les carences et prévenir les VADD, l'OMS et divers pays occidentaux dont le Canada, en collaboration avec des pays affectés en Asie et en Afrique, ont lancé diverses politiques d'enrichissement des aliments en vitamine A et des campagnes de supplémentation. Des suppléments sous forme d'acétate ou palmitate de rétinol sont disponibles

en gélules et ampoules, seuls ou en préparations mixtes de vitamines. Les industries alimentaires fortifient également plusieurs de leurs produits (laitiers, margarine, jus, salades) avec de la vitamine A ou avec des caroténoïdes. Dans les pays en développement concernés par les carences chroniques, l'OMS recommande une supplémentation de 100.000,00 UI chez les nourrissons entre 6-11 mois et de 200.000,00 UI pour les enfants au-delà de 12 mois. Appliquée à des intervalles de 3-6 mois, par exemple lors des moments de vaccinations, cette supplémentation a réduit la mortalité générale de 23 % à 30% dans ces groupes d'âge (OMS 2012). La xérophtalmie est également traitée avec succès par de fortes doses de vitamine A (50.000,00 à 200.000,00 UI) selon l'âge. Des supplémentations uniques (200.000,00 UI) post-accouchement chez la mère se sont également avérées bénéfiques, ayant augmenté la vitamine A disponible pour le nourrisson dans le lait. Cette méthode ne s'applique pas en cas de grossesse coexistente chez la mère allaitante, à cause des risques de toxicité et de malformations chez le fœtus advenant un surdosage de vitamine A.

Ce qui nous amène à parler de la sécurité de la vitamine A, les trop fortes doses étant notoirement toxiques. On parle d'une hypervitaminose A toxique lorsque la rétinolémie dépasse 4,5 mmol/l. Des effets nocifs apparaissent quand la capacité du foie à emmagasiner les RE est dépassée. Parmi eux : vomissements, douleurs et calcifications articulaires, migraines, desquamation de la peau, hémorragies, anorexie, entérites, augmentation du temps de coagulation, déminéralisation osseuse, ostéoporose, stéatoses avec insuffisance hépatique et malformations du fœtus. Plusieurs études chez des animaux ont démontré les effets de la toxicité des hypervitaminoses A (Lucke et al, 1968, Goldman 1992, Goldston and Hoskins, 1995, Freytag et al.2003). Ces hypervitaminoses peuvent survenir suite à des très grandes doses de vitamine A en prise unique ou suite à des accumulations sur une trop longue période de supplémentations non justifiées par des carences. Chez l'humain, rappelons le cas anecdotique d'intoxication aiguë d'un explorateur de l'Arctique qui a mangé du foie d'ours polaire (très riche en esters de ROL). Mais des accidents peuvent se produire même avec des suppléments en vente libre s'ils sont mal utilisés. Des recommandations sécuritaires pour l'utilisation humaine de la vitamine A selon les groupes d'âge ont donc été élaborées. Selon IOM 2001, durant la grossesse il ne faudrait pas dépasser une dose de 9300 UI/jour. Les autres recommandations sécuritaires d'apports maximaux tolérables (AMT) par jour et par groupes d'âge sont : 2000 UI / 600µg de 0 à 12 mois ; 2000 UI de 1 à 3 ans ; 3000 UI / 900µg de 4 à 8

ans ; 5667 UI / 1700µg de 9 à 13 ans ; 9333 UI / 2800µg de 14 à 18 ans et 10000 UI / 3000µg pour les 19 ans et plus. Ils sont en usage au Canada (Santé Canada 2012).

1.2.3. Absorption des rétinoïdes

La vitamine A est une vitamine liposoluble. Ainsi un métabolisme perturbé des lipides va diminuer l'absorption des rétinoïdes. Dans l'intestin grêle, les RE qui proviennent de la nourriture animale, sont d'abord émulsifiés par des sécrétions biliaires et ensuite hydrolysés (D'Ambrosio et al. 2011, Wongsiriroj et al. 2008). Une première hydrolyse a lieu dans l'intestin, sous l'influence de l'enzyme triglycéride-lipase pancréatique (PTL), et une autre hydrolyse catalysée par la rétinyl-ester hydrolase (REH) sur la membrane des cellules intestinales de la bordure en brosse (Figure 2). Dans les deux cas il en résulte du ROL qui va être intériorisé dans les entérocytes (D'Ambrosio et al. 2011, Wongsiriroj et al. 2008). A l'intérieur des entérocytes (Figure 2), le ROL est pris en charge par la protéine de transport cellulaire de rétinol 2 (CRBP2), une protéine qui protège le ROL et le présente à l'enzyme lécithine: rétinol acyl-transférase (LRAT) pour une ré-estérification intracellulaire (D'Ambrosio et al. 2011, O'Byrne SM et al. 2005). Lorsqu'il y a de grandes quantités de ROL dans les entérocytes, une deuxième enzyme peut subvenir aux besoins d'estérification; il s'agit de l'acyl-CoA : rétinol acyl-transférase (ARAT) qui peut contribuer à la ré-estérification intracellulaire du ROL (O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Une troisième enzyme, qui s'apparente à l'ARAT de par son mode d'action, la diacyl-glycérol acyl-transférase de type I (DGAT-I) (Figure 2) peut également être mobilisée pour compléter les besoins d'estérification de ROL intra-entérocytes (D'Ambrosio et al. 2011). Les RE ainsi obtenus, conjointement avec des triglycérides (TG), du cholestérol (Ch) et des apolipoprotéine B (apoB) sont englobés et intégrés aux chylomicrons (Figure 2) sous l'influence de la protéine de transfert microsomal de triglycéride (MTP) (D'Ambrosio et al. 2011). Les chylomicrons ainsi pourvus de rétinyl esters sont transférés hors des entérocytes, dans le réseau lymphatique (Figure 2) et poursuivent leur chemin dans le sang qui les apporte au foie (D'Ambrosio et al. 2011). Approximativement les deux tiers du ROL absorbé et ré-estérifié, sont ainsi distribués à partir des entérocytes par la lymphe (Hollander 1981). Environ le tiers du ROL absorbé par les entérocytes, restera non estérifié et non englobé en chylomicrons, et sera envoyé sous forme libre directement au foie par voie portale (Figure 4), (Hollander 1981).

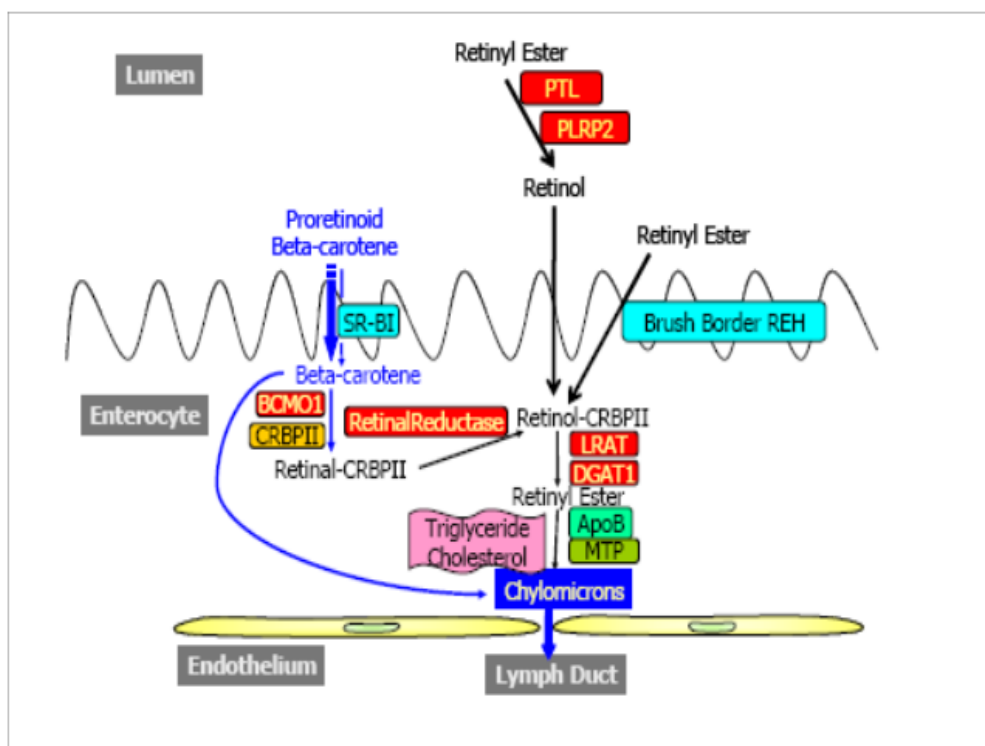


Figure 2. Digestion et absorption intestinale de la vitamine A

(D'Ambrosio et al. 2011, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, conformité FESP-Université de Montréal; liste d'acronymes en début de la thèse)

Les caroténoïdes sont absorbés dans les entérocytes via un récepteur membranaire de caroténoïdes (SR-BI) (Figure 2) ou encore par diffusion simple (D'Ambrosio et al. 2011). Les caroténoïdes ne sont pas détruits par la chaleur lors de diverses préparations alimentaires et leur absorption est encore meilleure. À l'intérieur des entérocytes, les caroténoïdes seront oxydés, et clivés. Ainsi le β -carotène, peut donner naissance à deux molécules de RAL alors que d'autres caroténoïdes à une seule (Blomhoff and Blomhoff 2006). Le clivage symétrique du β -carotène s'effectue sous l'influence de l'enzyme β -carotène oxygénase 1 (BCMO1) (Figures 2 et 3) et engendre deux molécules de RAL. Le clivage asymétrique du β -carotène, s'effectue sous l'influence de l'enzyme β -carotène oxygénase 2 (BCMO2) (Figure 3) et fournit deux molécules de β -apocaroténoïdes, de longueurs différentes (D'Ambrosio et al. 2011). La plus longue de ces molécules sera transformée en RAL et la plus courte en acide rétinoïque (AR) par des enzymes spécifiques (Wang XD and Krinsky 1997, Ziouzenkova O et al. 2007c).

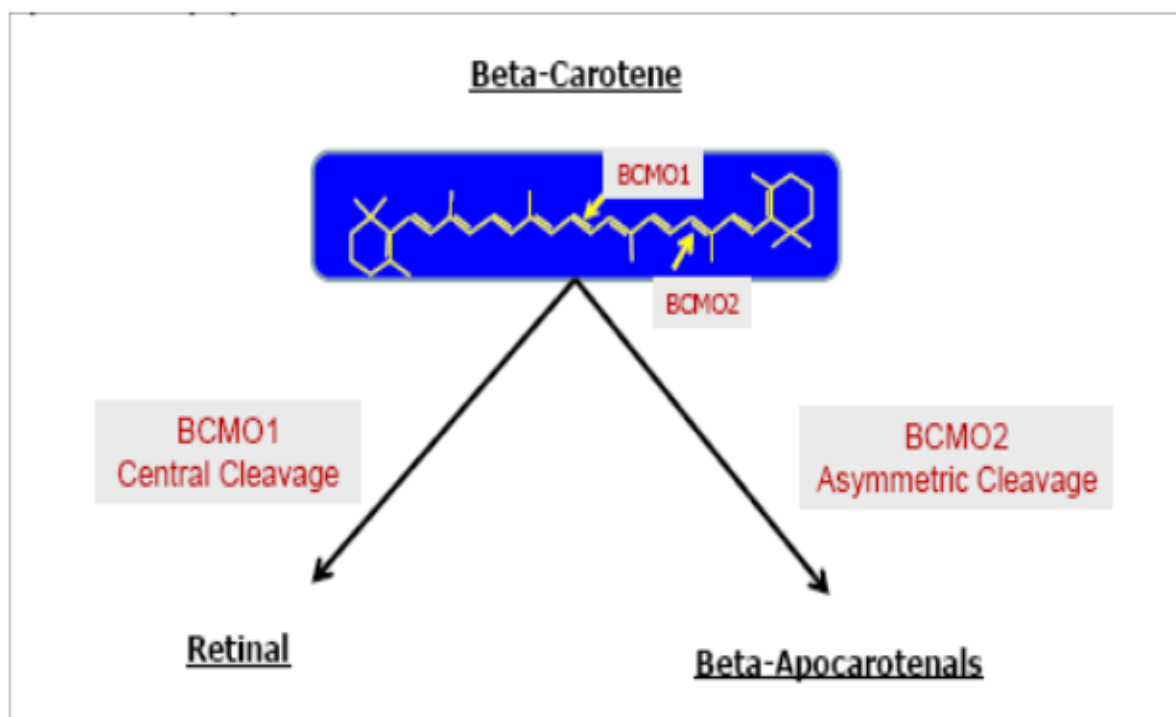


Figure 3. Clivage central et excentrique du β -carotène

(D'Ambrosio et al. 2011, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs; conformité FESP Université de Montréal; liste globale d'acronymes en début de la thèse)

1.2.4. Le foie, principal réservoir de vitamine A de l'organisme

Les RE synthétisés par les entérocytes sont inclus dans des chylomicrons et libérés dans le système lymphatique pour être ensuite livrés dans la circulation sanguine (Li Y. et al. 2014). Après avoir accompli leurs diverses fonctions envers les tissus cibles, les restants de chylomicrons de la circulation seront captés (ensemble avec leurs RE) en proportion approximative de 75% par le foie, principal site de stockage de la vitamine A (Shmarakov et al. 2013). Environ 25% des restants de chylomicrons sont captés par des tissus extra-hépatiques (O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Il existe également une absorption directe de ROL intestinal par le foie via la voie portale (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les hépatocytes intègrent ainsi la vitamine A fournie par l'alimentation et la transfèrent ensuite dans les cellules hépatiques étoilées («Ito»), dépositaires de la vitamine A sous forme de rétinyl esters (Blaner WS et al. 2009, De Luca L. M. 1991). Il y a un «dialogue» constant entre les hépatocytes régulières et les cellules hépatiques étoilées ce qui fait que les RE accumulés peuvent être ré-hydrolysés en ROL, ou le ROL ré-estérifié (majoritairement en palmitate de ROL) selon les demandes internes et

1.2.5. Circulation sanguine de la vitamine A

La protéine RBP4 (appelée aussi RBP), est le transporteur sanguin de ROL; elle est synthétisée par les hépatocytes et possède un poids moléculaire d'environ 21kDa (Napoli JL, 2016). Elle possède dans sa structure, une « poche » spécifique pour accueillir le ROL. Cette structure d'accueil et liaison de ROL est hydrophobe et peut solubiliser le ROL pour le transporter aux tissus cibles (Blomhoff and Blomhoff 2006). Quand le ROL se trouve lié à la RBP4, le complexe s'appelle holo-RBP4 alors que la RBP4 sans ROL s'appelle apo-RBP4. Lors de sa libération du foie dans la circulation, la holo-RBP4 (ROL-RBP4) est associée à la transthyréline (TTR) (D'Ambrosio et al. 2011). Ensuite le ROL est englobé dans les cellules de destination via le récepteur STRA6 (Li Y. et al. 2014) et l'apo-RBP4 détachée de la TTR sera décarboxylée et éliminée par le rein. Il existe également une circulation extra-hépatique de restants de chylomicrons et autres lipoprotéines (LDL, VLDL) qui apportent des RE et des caroténoïdes aux tissus périphériques (D'Ambrosio et al. 2011, Paik et al. 2004). Cet approvisionnement est complémentaire avec la voie hépatique d'approvisionnement en vitamine A, pour les tissus cibles qui possèdent les enzymes nécessaires pour hydrolyser les RE, cliver les caroténoïdes et oxyder le ROL en RAL et ensuite en AR (Moise et al. 2007). Ainsi, à part le ROL venant du foie, nous rencontrons plusieurs rétinoïdes en circulation (Figure 5) (O'Byrne S. M. and Blaner 2013) tels que: **a)** Acide rétinoïque lié à l'albumine (environ 1-3 nM); **b)** RE liés aux chylomicrons, à des restants de chylomicrons, aux LDL et aux VLDL (environ 100-200 nM); **c)** Glucuronidés (rétinoyl-b et rétinyl-b), environ 1-11 nM; **d)** divers caroténoïdes (environ 0,2-1,2 μ M) (Li Y. et al. 2014). Ces rétinoïdes seront ensuite captés et intégrés par les cellules cibles, avec l'aide de diverses lipases membranaires (ex. LPL) (D'Ambrosio et al. 2011).

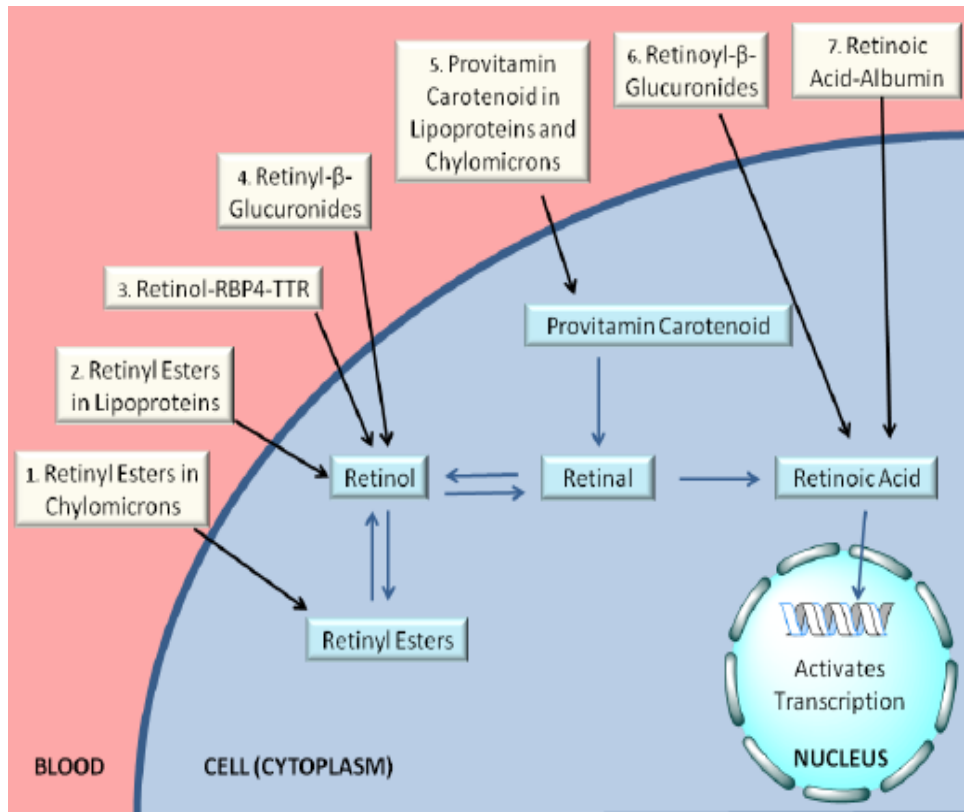


Figure 5 : Plusieurs formes de vitamine A sont présentes dans le sérum

(Li Y. and Blaner WS et al. 2014, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d’auteurs; conformité FESP-Université de Montréal; liste d’acronymes disponible en début de la thèse)

1.3. PROTEINES DE TRANSPORT DES RETINOIDES

1.3.1. Introduction

Il existe une panoplie de protéines spécifiques pour le transport des rétinoïdes dans le sang mais aussi dans les cellules. Il est connu que la RBP4 (RBP) hépatique est la protéine de transport du ROL dans le sérum, jusqu’aux cellules cibles (Li Y. et al. 2014, Napoli JL.1996a, 2012, 2016). A l’intérieur des cellules (Figure 6), le ROL, le RAL et l’AR sont pris en charge par des protéines spécifiques (transporteurs cellulaires) qui les stabilisent, les protègent d’une dégradation hâtive et les présentent aux enzymes appropriées (chaperonnage), pour remplir leurs rôles métaboliques. Les principales protéines cellulaires de transport de rétinoïdes (Figure 6) pour le ROL et le RAL sont les CRBP-1, CRBP-2, CRBP-3 (certains auteurs citent l’équivalent I, II, III), le CRALBP pour le rétinol en fonction visuelle et CRABP-1 et CRABP-2 pour l’acide

rétinoïque (Gottesman ME et al. 2001a, O'Byrne S.M. and Blaner 2013). Ces protéines sont très bien conservées dans la phylogénie évolutive et possèdent une affinité forte pour de petites molécules liposolubles et hydrophobes telles que les rétinoïdes (Ong 1994, Ong et al. 2000). Les principaux ligands, pour ces transporteurs cellulaires de rétinoïdes sont illustrés dans le Tableau 1. La CRBP-1 est très abondamment exprimée dans le foie et le tissu adipeux, dans une moindre mesure dans d'autres tissus et n'est pas exprimée dans les muscles et le cœur. La CRBP-2 est exprimée uniquement dans la paroi du petit intestin (D'Ambrosio et al. 2011). La CRBP-3 est exprimée dans le gras, les muscles et le cœur et abondamment dans les glandes mammaires afin de faciliter le transfert de rétinoïdes dans le lait (D'Ambrosio et al. 2011, Piantadosi et al. 2005). La CRALBP lie spécifiquement le 11-cis-RAL, le 9-cis-RAL, dans une moindre mesure le 11-cis-ROL, et est exprimée uniquement dans les organes associés directement ou indirectement à une photosensibilité (rétine, cornée, nerf optique, glande pinéale, cerveau), (D'Ambrosio et al. 2011). Pour les protéines de transport cellulaire d'AR, la CRABP-1 est bien exprimée dans la plupart des tissus avec une plus forte expression dans le cerveau, la peau et les testicules, alors que la CRABP-2 est exprimée fortement dans les organes reproducteurs, le fœtus, les reins, la peau et divers épithéliums (D'Ambrosio et al. 2011). Le ratio molaire entre ces transporteurs cellulaires et les rétinoïdes qu'ils lient penche en faveur des transporteurs, donc la chance d'avoir des rétinoïdes non liés à l'intérieur de la cellule est minime. Ceci protège également les membranes cellulaires contre des rétinoïdes libres qui peuvent déstabiliser leurs structures.

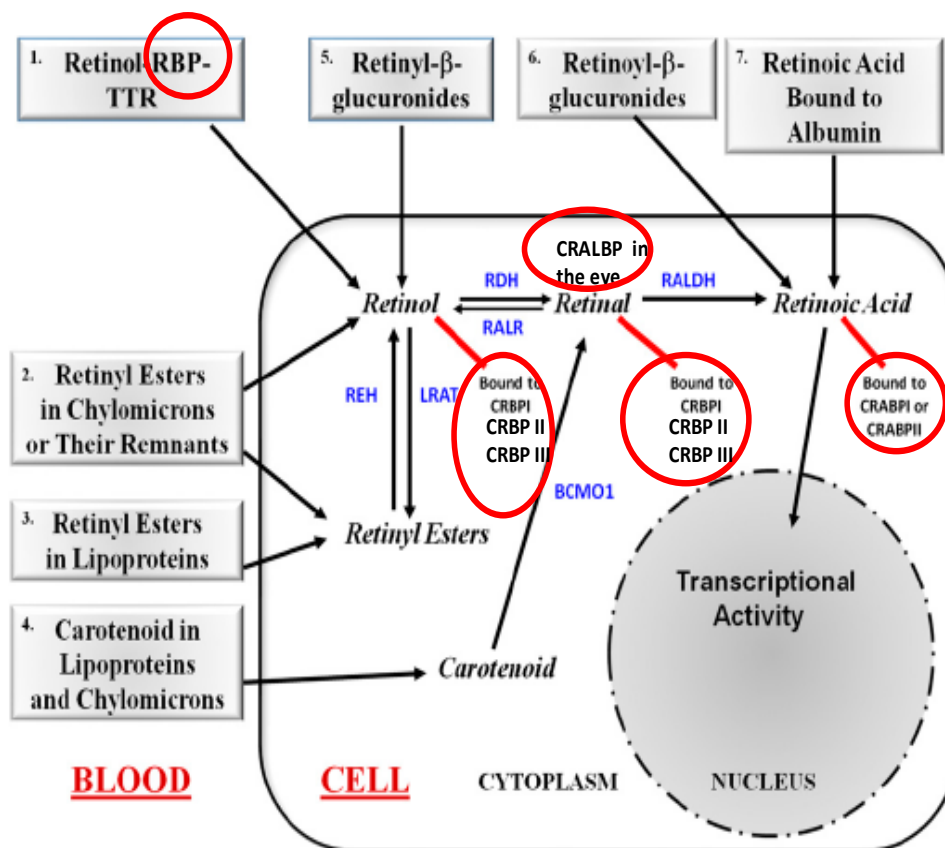


Figure 6. Ligands des protéines cellulaires de transport des rétinoïdes.

(O’Byrne SM et al. 2013, disponible en libre accès, citation en original et adaptations Manolescu DC 2010, 2016 sans préjudices aux droits d’auteurs; conformité FESP- Université de Montréal; liste d’abréviations en début de la thèse)

1.3.2. RBP4/RBP, protéine de transport sérique du rétinol et son récepteur STRA6

En 1968, Goodman et al. ont découvert l’existence d’une protéine de transport de la vitamine A dans le sang, d’environ 21kDa qu’ils ont nommée « *retinol-binding protein* » - RBP (Kanai et al. 1968). Plus tard, en 2005, la même molécule a été renommée RBP4 (Yang et al. 2005). Depuis sa découverte, la RBP4 fut caractérisée et étudiée intensivement pour sa structure moléculaire, sa synthèse et son rôle de transporteur de ROL (Blaner W. S. 1989, Goodman D. S. 1974, 1982, Peterson and Rask 1971). Le foie est le principal lieu de production de la RBP4, et le ROL sera mobilisé à partir des réserves du foie pour être libéré dans la circulation lié de façon équimolaire 1:1 avec la RBP4 (Napoli JL 2016, Napoli JL 1996a). La RBP4 n’est pas nécessaire au transport intra-hépatique du ROL. Une déficience de la RBP4 n’est pas létale pour les embryons de souris. Néanmoins, elle affecte grandement la vision de ces animaux (Frey and Vogel 2011, Vogel et al. 2001). Même si le foie est le site majeur de synthèse et de sécrétion de RBP4, d’autres organes et tissus, principalement le tissu adipeux, expriment la RBP4 (Quadro L et al. 2003, 2004, Tsutsumi et al. 1992). Ainsi les adipocytes

synthétisent et libèrent en circulation approximativement 20% de la RBP4 totale circulante (Tsutsumi et al. 1992). Dans des conditions physiologiques, le taux d'holo-RBP4 circulante (ROL-RBP4) reste constant et change principalement en réponse à des apports externes supplémentaires de vitamine A ou dans certaines maladies (Blaner W. S. 1989). La holo-RBP4 circulante livre du ROL à tous les tissus qui en ont besoin dans l'organisme. L'existence des récepteurs membranaires (STRA6) (Figure 7) qui facilitent l'absorption cellulaire du ROL venant de la holo-RBP4 a été démontrée (Blaner WS 2007, Kawaguchi et al. 2007, Li Y. et al. 2014). La RBP4 libre restante (apo-RBP4) sera décarboxylée et éliminée dans l'urine. La RBP4 est le seul transporteur spécifique de ROL dans le sérum, connu à l'heure actuelle. Elle a une structure polypeptidique avec une «poche» pour englober le ROL et le transporter ensuite aux tissus (Blomhoff and Blomhoff 2006). Lors de sa libération du foie dans le sang, la holo-RBP4 (ROL-RBP4) est immédiatement associée à la transthyréline (TTR) (D'Ambrosio et al. 2011). Cette protéine d'environ 55kDa augmente le poids moléculaire du nouveau complexe ROL-RBP4-TTR à environ 75kDa, évitant ainsi une filtration et une élimination hâtives du ROL-RBP4 dans l'urine (Napoli JL 1996a). Le rôle du TTR d'empêcher la filtration glomérulaire hâtive de la RBP4 a été confirmé lorsque de la RBP4 injectée dans des souris TTR-KO s'est rapidement retrouvée dans l'urine (D'Ambrosio et al. 2011, Wei et al. 1995). Le rôle de la RBP4 dans le transport sanguin spécifique du ROL a été confirmé par plusieurs recherches, qui ont démontré que les souris RBP-KO ont une concentration sérique basse de ROL, alors que les réserves de vitamine A dans le foie sont élevées (Quadro L et al. 2003). Pour une diète qui est riche en rétinoïdes il n'y aura pas de phénotypes de carence, même en absence de RBP4, car des mécanismes complémentaires (chylomicrons résiduels, LDL, VLDL) transporteront les rétinoïdes (O'Byrne S. M. and Blaner 2013, Paik et al. 2004). Ainsi, selon les études réalisées chez la souris et l'humain (Seeliger et al. 1999), il semble que la RBP devient essentielle pour la mobilisation du ROL dans le foie, surtout lorsque la diète est insuffisante en vitamine A (Noy 2000). Bien qu'il existe des voies complémentaires (chylomicrons résiduels, LDL, VLDL) de transport de rétinoïdes (RE, AR) dans le sang (Li Y. et al. 2014), le complexe ROL-RBP4 demeure essentiel pour le transport sérique du ROL et pour l'homéostasie de la vitamine A, indépendamment du niveau des rétinoïdes dans la diète.

Le récepteur membranaire STRA6 (Figure 7) reconnaît le ROL du tandem ROL-RBP4 et permet la translocation du ROL dans la cellule (D'Ambrosio et al 2011, Napoli JL. 2012, 2016). Il facilite ainsi l'entrée dans le cytoplasme du ROL circulant venant du complexe ROL-RBP4 (Blaner WS 2007, Kawaguchi et al. 2007). Il peut également fonctionner de façon bidirectionnelle, libérant de petites quantités de ROL dans la circulation (Berry et al. 2012c, Isken et al. 2008). Les concentrations de la protéine STRA6 augmentent du stage de pré-adipocytes vers les adipocytes adultes, et sont soumises à plusieurs régulations, dont une post-traductionnelle (Muenzner et al. 2013, Wu J. et al. 2014, Zemaný et al. 2014). D'autres études démontrent des signalisations via STRA6 dans les tissus adipeux (notamment en relation avec ROL, RBP4, LRAT et RAR), qui influencent le métabolisme des lipides et la réponse à l'insuline, tout en contrôlant l'adipogenèse via le métabolisme des rétinoïdes (Berry et al. 2011, Isken et al. 2008). Selon d'autres auteurs, il pourrait également y avoir (à plus petite échelle) une diffusion directe du ROL provenant des RE des chylomicrons, diffusion facilitée par l'enzyme LPL (lipoprotéines lipase) (D'Ambrosio et al. 2011, Gottesman ME et al. 2001a). En dehors du captage de ROL, le STRA6 joue un rôle important de signalisation dans les cellules et son absence provoque de graves malformations chez l'humain (Sun and Kawaguchi 2011). Selon des études récentes, la RBP4 et le STRA6 auraient également un rôle important dans la sensibilité cellulaire à l'insuline, et pourraient avoir des implications de signalisation plus complexes dans l'obésité et le diabète de type 2 (Berry and Noy 2012, Berry et al. 2012c). Toujours dans l'obésité et le diabète de type 2, certaines études ont démontré que la RBP4 peut être synthétisée non seulement par le foie mais aussi comme adipokine par le tissu adipeux. Il n'a pas été démontré que l'adipokine RBP4 pourrait sortir du ROL des adipocytes, mais il a été démontré qu'elle est impliquée dans la résistance à l'insuline, l'obésité et diabète de type 2 (Yang et al. 2005). Plusieurs études ont observé des liens potentiels entre le métabolisme des rétinoïdes, l'obésité et le diabète de type 2 (Graham TE et al. 2006b, Manolescu et al. 2010, Sima et al. 2011).

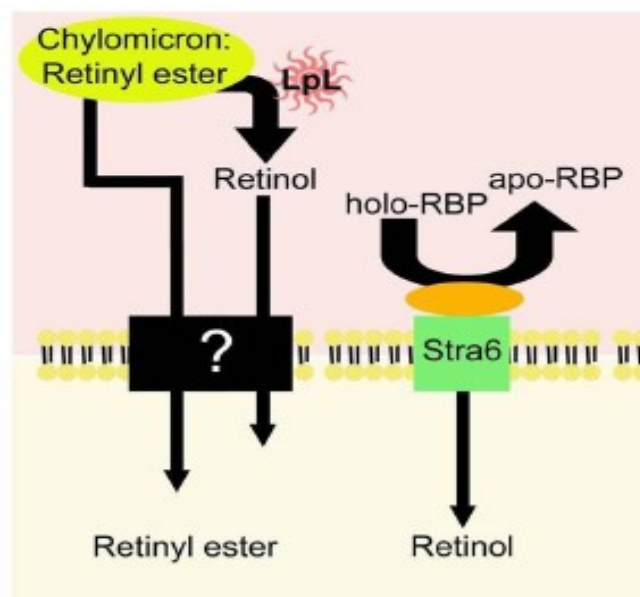


Figure 7. Absorption de ROL du tandem ROL-RBP4 via le récepteur membranaire STRA6

(D'Ambrosio DN et al.2011, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, respecte la politique FESP Université de Montréal; liste d'abréviations disponible en début de la thèse)

1.3.3. CRBP 1, 2 et 3, protéines de transport intracellulaire de rétinoïdes

À l'intérieur des cellules, les rétinoïdes (ex. ROL, RAL, AR) sont captés par des protéines de transport intracellulaire de rétinoïdes (Napoli JL,1991,2000,2016) , qui les solubilisent, optimisent leur présentation aux enzymes cytosoliques spécifiques, les protègent d'oxydations inappropriées et améliorent leur efficacité métabolique (Gottesman ME et al. 2001a, O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Les transporteurs cellulaires de rétinoïdes qui manifestent de l'affinité pour le ROL, le RAL et leurs isomères métaboliques, sont les CRBP-1 (« *cellular retinoid binding proteins 1* »), CRBP-2 et CRBP-3 (Napoli JL, 1991, 2012, 2016). Il existe aussi une protéine spécifique pour le RAL, présente uniquement dans les organes impliqués dans la fonction visuelle, la CRALBP (D'Ambrosio et al. 2011). Ces transporteurs cellulaires de rétinoïdes ont une grande affinité pour des petites molécules hydrophobiques tels que les rétinoïdes (Ong 1994, Ong et al. 2000). Ils sont bien conservés dans l'évolution et partagent beaucoup de similarités de structure. Cependant ils se différencient également par plusieurs de leurs caractéristiques et l'expression préférentielle dans différents tissus (D'Ambrosio et al. 2011, Noa Noy 2000). La CRBP-1 est une molécule avec un poids moléculaire d'environ 14 kDa, bien exprimée dans les reins, testicules, yeux et poumons avec toutefois une dominance dans les cellules étoilées *Ito* du foie (Blaner WS et al. 2009, D'Ambrosio et al.2011). Elle est

également présente dans les tissus adipeux où elle est impliquée dans le contrôle de la différenciation des pré-adipocytes (Frey and Vogel 2011). Un manque de CRBP-1 mène à une augmentation de la différenciation cellulaire des pré-adipocytes et de l'activité de PPAR γ (Zizola et al. 2010). La CRBP-2 est une molécule d'un poids moléculaire de 16kDa qui est exprimée uniquement dans les cellules de la bordure en brosse de l'intestin grêle (D'Ambrosio et al. 2011, Noa Noy 2000). La CRBP-1 a plus de spécificité pour le ROL que la CRBP-2, alors que les deux molécules manifestent le même potentiel pour le RAL (Noy 2000). La CRBP-1 stabilise et solubilise le ROL et le RAL qu'elle prend en charge, et optimise la transformation enzymatique du ROL en RAL par les RDH et du RAL en AR par les RALDH (Figure 6) (Blomhoff and Blomhoff 2006, O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Elle optimise aussi l'hydrolyse des ER en ROL et l'estérification inverse au besoin, par l'enzyme LRAT (lécithine-rétinol acyl-transférase), (Napoli J. L. 2012, O'Byrne SM et al. 2005). Très bien exprimées dans le foie, particulièrement dans les cellules étoilées *Ito*, les protéines CRBP-1 et LRAT sont très importantes pour la formation et la mise en réserve de RE (Blaner WS et al. 2009, Napoli J. L. 2012, 2016). Alors qu'une diminution des RE dans le foie est logique pour des animaux LRAT-KO, il a été observé que des souris CRBP-1/KO se retrouvent aussi avec moins de RE dans les cellules étoilées *Ito* (Ghyselinck et al. 1999). Ceci peut défavoriser ces animaux lors d'une diète pauvre en rétinoïdes, car une réserve appropriée de RE dans le foie est nécessaire pour maintenir l'homéostasie de la vitamine A sanguine en tout temps (Blomhoff and Blomhoff 2006). Il a été constaté que l'administration d'AR augmente l'expression de la CRBP-1 (Blaner WS et al. 1986).

La CRBP-2 est exprimée spécifiquement dans les cellules de la bordure en brosse de l'intestin grêle (D'Ambrosio et al. 2011, Noa Noy 2000) où elle prend en charge le ROL et/ou les RE arrivés par la nourriture d'origine animale, ou encore le RAL venant des caroténoïdes clivés d'origine végétale (O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Elle est une protéine importante dans l'intestin, car elle représente 1% de la totalité des protéines des entérocytes du petit intestin (Li E and Norris 1996, Ong 1994). La CRBP-2 joue un rôle important dans la ré-estérification du ROL et du RAL dans les cellules intestinales de la bordure en brosse, puisqu'elle présente le ROL à l'enzyme d'estérification LRAT (Blomhoff and Blomhoff 2006, Harrison 2005). Le RAL doit subir au préalable une réduction en ROL, et durant cette réaction le RAL est couplé à la CRBP-2. Comme pour la CRBP-1, la CRBP-2 solubilise et assure en tout temps la protection

du ROL et du RAL contre l'oxydation hasardeuse et non-métabolique (ex. stress oxydatif), mais également la protection des membranes cellulaires contre des rétinoïdes de transfert libres dans le cytoplasme (Harrison 2005). La CRBP-2 est importante pour l'absorption des rétinoïdes dans l'intestin grêle, comme démontré chez des rongeurs transgéniques dépourvus de cette protéine (CRBP-2/KO) et qui ont une absorption de rétinoïdes réduite de 40% (E X Zhang et al. 2002). Il y a également une augmentation de l'expression (mRNA) de la CRBP-2 dans les entérocytes de rongeurs soumis à une nourriture pauvre en vitamine A, probablement pour optimiser au maximum la captation des rétinoïdes disponibles (Rajan et al. 1991). Lorsque des quantités abondantes de vitamine A sont consommées, l'ARAT, une enzyme complémentaire du LRAT, contribue à l'estérification du ROL dans les entérocytes (Ong 1994). Contrairement à la CRBP-1, l'expression de la CRBP-2 est diminuée avec un traitement à l'AR (Blaner WS et al. 1986).

La CRBP-3 est exprimée abondamment dans les glandes mammaires (D'Ambrosio et al. 2011) où, avec le LRAT, elle facilite le transfert des RE dans le lait (Blomhoff and Blomhoff 2006, Piantedosi et al. 2005). Elle est également exprimée dans le cœur, les muscles et le gras où elle complète l'activité de la CRBP-1 en cas d'abondance de rétinoïdes (Piantedosi et al. 2005). Il a également été observé que la CRBP-3 soutient la différenciation d'adipocytes et que sa diminution mène à un développement réduit du tissu adipeux et à une activité moindre du PPAR γ (Frey and Vogel 2011, Zizola et al. 2008). En bref, les transporteurs cellulaires de rétinoïdes CRBP-1, CRBP-2, CRBP-3, solubilisent les rétinoïdes (à l'origine seulement liposolubles), les protègent de la dégradation accidentelle (ex.: radicaux libres, stress oxydatif) et facilitent l'estérification du ROL par l'enzyme LRAT (Batten et al. 2004) ou encore l'oxydation de ROL en RAL ou la réaction inverse de réduction de RAL en ROL selon les besoins (Blomhoff and Blomhoff 2006). Le Tableau 1 indique les ligands et les principaux tissus exprimant les CRBP-1, CRBP-2 et CRBP-3 ainsi que pour d'autres transporteurs intracellulaires des rétinoïdes (D'Ambrosio et al. 2011).

1.3.4. CRABP 1 et 2, protéines de transport intracellulaire de l'acide rétinoïque

Il existe deux protéines cellulaires de transport d'AR : CRABP1 et CRABP2 (Napoli JL 1991, 1999, 2016, O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Elles ont un poids moléculaire de 14kDa chacune. Elles ont aussi en commun 75% de leurs structures et sont membres de la famille de

protéines de liaison pour des acides gras (O'Byrne S. M. and Blaner 2013). Comme pour les CRBP, leurs structures ont été bien préservées au long de l'évolution des vertébrés, ce qui atteste de leur importance métabolique (Gorry et al. 1994, Zheng and Ong 1998). La CRABP1 est exprimée de façon assez large avec des niveaux plus élevés dans le cerveau, la peau et les testicules (D'Ambrosio et al. 2011). La CRABP2 est bien exprimée dans la peau, les glandes mammaires, l'utérus, les ovaires, les reins, la prostate, le tissu adipeux et divers épithéliums dont l'olfactif (D'Ambrosio et al. 2011). La CRABP2 est plus sensible à l'AR car un traitement à l'acide rétinoïque sur des cellules de peau humaine, augmente l'expression de la CRABP2 et pas celle de la CRABP1 (Aström et al. 1991). Dans les pré-adipocytes la CRABP2 est impliquée dans l'inhibition de leur différenciation cellulaire modulée par l'AR via RAR (Frey and Vogel 2011). Son inhibition permet l'accélération du processus de différenciation cellulaire des pré-adipocytes (Berry et al. 2010). Sa stimulation augmente l'expression et l'activité des RARs (Dong et al. 1999) ayant comme conséquence une adipogenèse diminuée lorsque associée avec l'activation des dimères RAR/PPAR β/δ (Berry et Noy 2009). Les CRABP1 et CRABP2, permettent le transfert d'AR dans le noyau afin de pouvoir accéder à ses récepteurs nucléaires RAR et RXR, la CRABP2 étant prioritaire. En effet lorsqu'elle s'accumule normalement dans le cytoplasme, la CRABP2 répond immédiatement à l'apparition de son ligand (AR) pour le transférer dans le noyau. De plus, elle guide son ligand (AR) lors de la jonction avec RAR, se positionnant elle-même sur le RAR ou RXR («*channeling*») pour bien diriger le transfert de l'AR sur ses récepteurs, ce qui augmente l'efficacité de la réaction (Bastie et al. 2001, Budhu and Noy 2002, Delva et al. 1999). Le mécanisme d'action de l'AR sur ses récepteurs nucléaires RAR et RXR ressemble à celui des hormones stéroïdiennes (Bashor et al. 1973). Spécifique pour la CRABP1 est la possibilité de translocation de cette protéine, et de l'AR venant avec elle, dans la mitochondrie, ce qui suggère un rôle de la mitochondrie dans le catabolisme de l'AR (Ruff and Ong 2000). Ceci suggère une capacité accrue des cellules ayant une expression élevée de CRABP1 à dégrader l'AR (Boylan J. F. and Gudas 1992b), capacité possiblement complémentaire à l'oxydation par le cytochrome CYP26A1 (Fiorella and Napoli 1994). L'acide rétinoïque, ayant rempli son rôle métabolique sur ses récepteurs nucléaires RAR et RXR, sera ensuite pris en charge et dégradé par les cytochromes CYP26A1 et CYP26B1. Également pour tout surplus éventuel d'AR. Dans ce processus, les transporteurs CRABP1 et CRABP2 vont optimiser la réaction d'oxydation en métabolites polaires en présentant l'AR aux cytochromes

CYP26A1 et CYP26B1 (Blomhoff and Blomhoff 2006). Dans l'ensemble, les protéines CRABP1 et CRABP2, remplissent des tâches importantes telles que : la solubilisation de l'AR, la protection de l'AR contre la dégradation oxydative précoce (ex. : radicaux libres, stress oxydatif), la translocation de l'AR dans le noyau pour remplir son rôle de ligand nucléaire, chaperons de guidance de l'AR vers les récepteurs RAR et RXR jouant ainsi un rôle de coactivateurs pour la transcription de plusieurs gènes, ou encore chaperons de guidance pour la dégradation contrôlée de l'AR en métabolites polaires. Le Tableau 1 indique les ligands et les principaux tissus exprimant les CRABP1 et CRABP2 et d'autres transporteurs intracellulaires des rétinoïdes (D'Ambrosio et al. 2011).

Table 1. Retinoid-binding proteins in the adult mouse

Protein	Other Designations	Protein Family	Major Retinoid Ligands	Tissue Localization
RBP	RBP4	Lipocalin	<i>all-trans</i> -retinol	Many, with high levels in liver and adipose
IRBP	RBP3	–	<i>all-trans</i> -retinol <i>11-cis</i> -retinal	Retina
CRBPI	RBP1	iLBP	<i>all-trans</i> -retinol <i>all-trans</i> -retinal	Many, with high levels in liver, kidney, testis, eye, lung
CRBP II	RBP2	iLBP	<i>all-trans</i> -retinol <i>all-trans</i> -retinal	Small intestine
CRBP III	RBP7	iLBP	<i>all-trans</i> -retinol	Heart, muscle, adipose, mammary
CRABPI	RBP5	iLBP	<i>all-trans</i> -retinoic acid	Ubiquitous expression, with high levels in brain, skin and testes
CRABP II	RBP6	iLBP	<i>all-trans</i> -retinoic acid	Primarily skin; also found in mammary, uterus, kidney, prostate and olfactory epithelium
CRALBP	RLBP1	CRAL_Trio	<i>11-cis</i> -retinal <i>11-cis</i> -retinol <i>9-cis</i> -retinal	RPE, retina, ciliary body, cornea, pineal gland, optic nerve, brain

Tableau 1. Fonctions et emplacements des principales protéines de transport des rétinoïdes

(D'Ambrosio et al. 2011, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme aux règlements de la FESP- Université de Montréal; liste globale d'acronymes en début de la thèse)

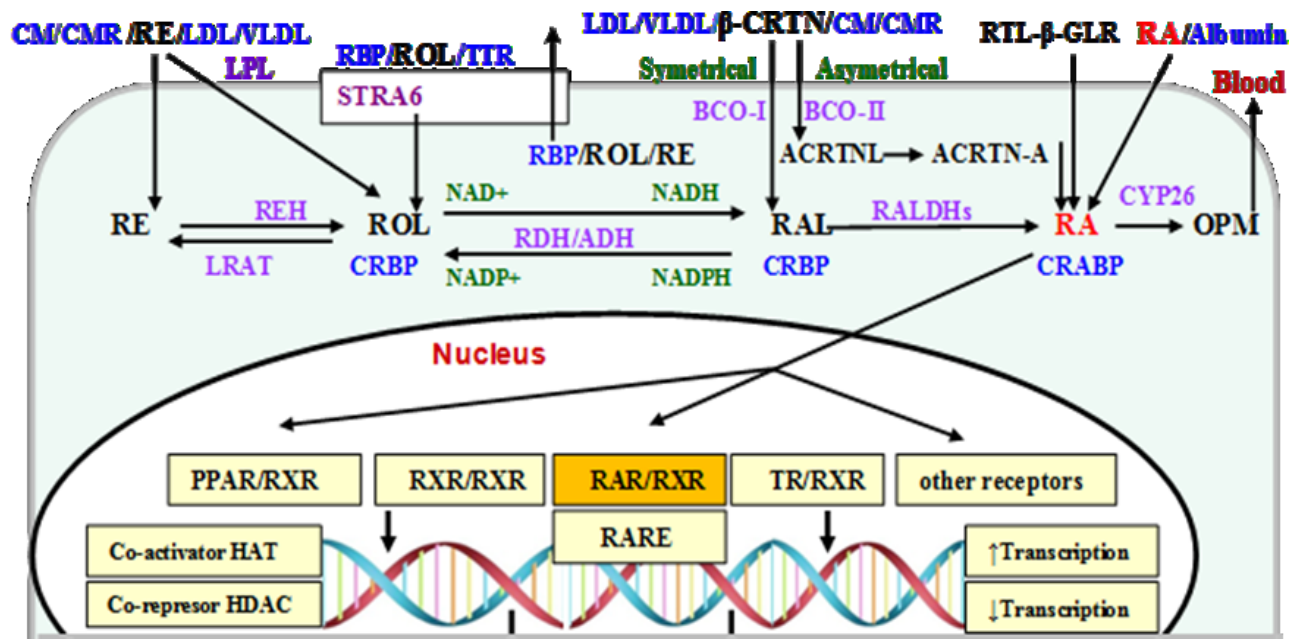


Figure 8. Métabolisme intracellulaire de la vitamine A

(Manolescu DC 2017, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme aux règlements de la FESP-Université de Montréal; liste globale d'acronymes disponible en début de la thèse)

1.4.1. Vitamine A sous forme d'acide rétinoïque

1.4.1.1. Introduction à l'acide rétinoïque

Il est actuellement unanimement accepté que les rétinoïdes sont impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires, de l'embryon jusqu'à la mort (Napoli JL 1996a). L'acide rétinoïque est une forme active de la vitamine A, liposoluble, avec une masse moléculaire de **300Da**. L'AR est capable de moduler (activer ou réprimer selon les contextes) l'expression des gènes du métabolisme de la vitamine A, et de plusieurs autres gènes impliqués dans l'embryogenèse, l'intégrité épithéliale, l'immunité, les métabolismes des lipides et des glucides ainsi que d'autres axes métaboliques (Blomhoff and Blomhoff 2006).

La déficience ou l'excès intracellulaire d'acide rétinoïque sont très dommageables. Par conséquent les taux cellulaires d'AR sont strictement contrôlés par un équilibre actif entre les enzymes de production et celle du catabolisme d'AR (Figure 8) (Napoli J. L. 2012). Le all-*trans* et 9-*cis* AR exercent leurs effets par liaison à leurs récepteurs nucléaires (RAR et RXR) qui forment des dimères entre eux et avec d'autres récepteurs spécifiques (ex. : « *thyroïde hormone récepteurs* » -TR, « *vitamine D récepteurs* » -VDR, « *peroxysome proliférateur-active récepteurs* » – PPAR) ou des récepteurs orphelins (sans ligand identifié) (Chambon P 2005).

Les récepteurs RARs α, β, γ sont activés par le *all-trans* AR et le *9-cis* AR, alors que les récepteurs RXRs α, β, γ sont activés seulement par la forme *9-cis* AR (Brun et al. 2013, Heyman et al. 1992, Napoli JL 1999, Zhang XK et al. 1992). Chaque récepteur est exprimé selon les tissus, mais la majorité des cellules expriment les deux, RAR et RXR. Les récepteurs nucléaires contrôlent l'activité de plusieurs cascades géniques, par couplage à des séquences d'ADN nommées RARE (éléments de réponse à l'acide rétinoïque), sur les promoteurs des gènes (Blomhoff and Blomhoff 2006). La caractérisation des promoteurs de plusieurs gènes dépendants de l'AR a mené à la description de ces RARE (Chambon P 2005). Les récepteurs comme RAR, TR, VDR et PPAR et aussi plusieurs récepteurs orphelins, se couplent à leurs éléments de réponse comme hétéro-dimères avec les RXR, ce qui leur permet de les activer, même quand leur ligand spécifique est en trop petite quantité pour les activer seul (Mangelsdorf 1994, Mangelsdorf et al. 1993, Mangelsdorf et al. 1990). Dans les hétéro-dimères RAR-RXR, l'activité de transcription est contrôlée par le lien d'*all-trans* ou *9-cis* AR à la portion RAR de l'hétéro-dimère (Blomhoff and Blomhoff 2006, Germain et al. 2006a, b). L'acide rétinoïque est également un agent immuno-modulateur puissant (Kim CH 2008). Il est utilisé dans le traitement de plusieurs cancers (Moise et al. 2007). Il est également de plus en plus reconnu pour son potentiel anti-obésité (Berry et al. 2012b, Bonet et al. 2012, Manolescu et al. 2010, 2014). L'acide rétinoïque a des effets non-génomiques aussi, tels que la modulation de l'activité de certaines enzymes, la stimulation de certains neurotransmetteurs et la rétinoylation de certaines protéines (Blomhoff and Blomhoff 2006, Brun et al. 2013, Pingitore et al. 2009). L'acide rétinoïque possède également des propriétés thérapeutiques dermatologiques. Le *13-cis* AR, troisième isomère de l'AR (Figure 9) ne possède pas d'activité génique et est utilisé en dermatologie (Thielitz et al. 2008).

1.4.1.2. Biosynthèse et isomères de l'acide rétinoïque

Il existe trois isomères d'acide rétinoïque (Figures 1 et 9), soit le *at*-AR, le *9-cis* AR et le *13-cis* AR (O'Byrne S. M. and Blaner 2013), les deux premiers avec activité génomique et le *13-cis* AR sans activité génomique, mais avec une grande influence sur la peau (Thielitz et al. 2008) et d'autres activités biologiques (Blaner WS 2001). Le *at*-AR est le ligand pour les récepteurs RARs et le *9-cis* AR peut lier et les RXRs et les RARs (Brun et al. 2013). Deux étapes d'oxydations enzymatiques (Figures 8 et 9) convertissent d'abord le ROL vers RAL

(étape réversible) et ensuite le RAL vers AR (étape irréversible) (Blomhoff and Blomhoff 2006). Dans les entérocytes il existe aussi une synthèse directe d'AR, à partir des produits du clivage asymétrique du β -carotène (Figures 3 et 8), les β -apo-caroténals et les acides β -apo-caroténoïques (Wang XD and Krinsky 1997). L'AR est essentiel pour une multitude de processus physiologiques dans l'organisme. Cependant, son action dépend de la qualité de sa biosynthèse, car les défauts d'oxydation des rétinoïdes en amont (ROL et RAL) perturbent la biogenèse de l'acide rétinoïque (Napoli J.L. 2012). La biosynthèse des trois isomères de l'acide rétinoïque est un processus de double oxydation bien contrôlée impliquant la participation de protéines de liaison et d'enzymes spécifiques (Napoli J.L. 1999, 2012, 2016). Il est cependant possible d'obtenir les isomères 9-*cis* et 13-*cis* AR par une isomérisation physico-chimique directe de l'acide rétinoïque *at*-AR et sans passer par une oxydation enzymatique préalable (Urbach and Rando 1994). Par contre, certaines études affirment que des oxydations enzymatiques préalables sont nécessaires, et de plus sur des axes des substrats isomériques homologues (Figure10), soit *at*-ROL, *at*-RAL, *at*-AR, 9-*cis* ROL, 9-*cis* RAL, 9-*cis* AR et 13-*cis* ROL, 13-*cis* RAL et 13-*cis* AR (Blaner WS 2001, Duester 2000). D'autres études suggèrent qu'à partir de RE il existe une enzyme capable de transformer des *at*-RE en 9-*cis* ROL, les oxydations subséquentes sur l'axe 9-*cis* menant ensuite à 9-*cis* RAL et 9-*cis* AR (Lidén and Eriksson 2005). Sur la voie inverse (Figure10), il est suggéré qu'une isomérisation du 13-*cis* AR peut produire du *at*-AR, comme possibilité secondaire (Armstrong et al. 2005). Il est difficile d'identifier et quantifier l'isomère 9-*cis* AR *in vivo*, soit parce qu'il est produit en très petite quantité et vite utilisé, soit parce qu'il est instable, lui aussi pouvant s'isomériser vite en *at*-AR (Figure10). En appui à sa dégradation rapide, certains chercheurs ont démontré une stimulation majeure de l'expression du cytochrome Cyp26A1 (qui dégrade les isomères d'AR) après un traitement avec 9-*cis* AR (Luo et al. 2006).

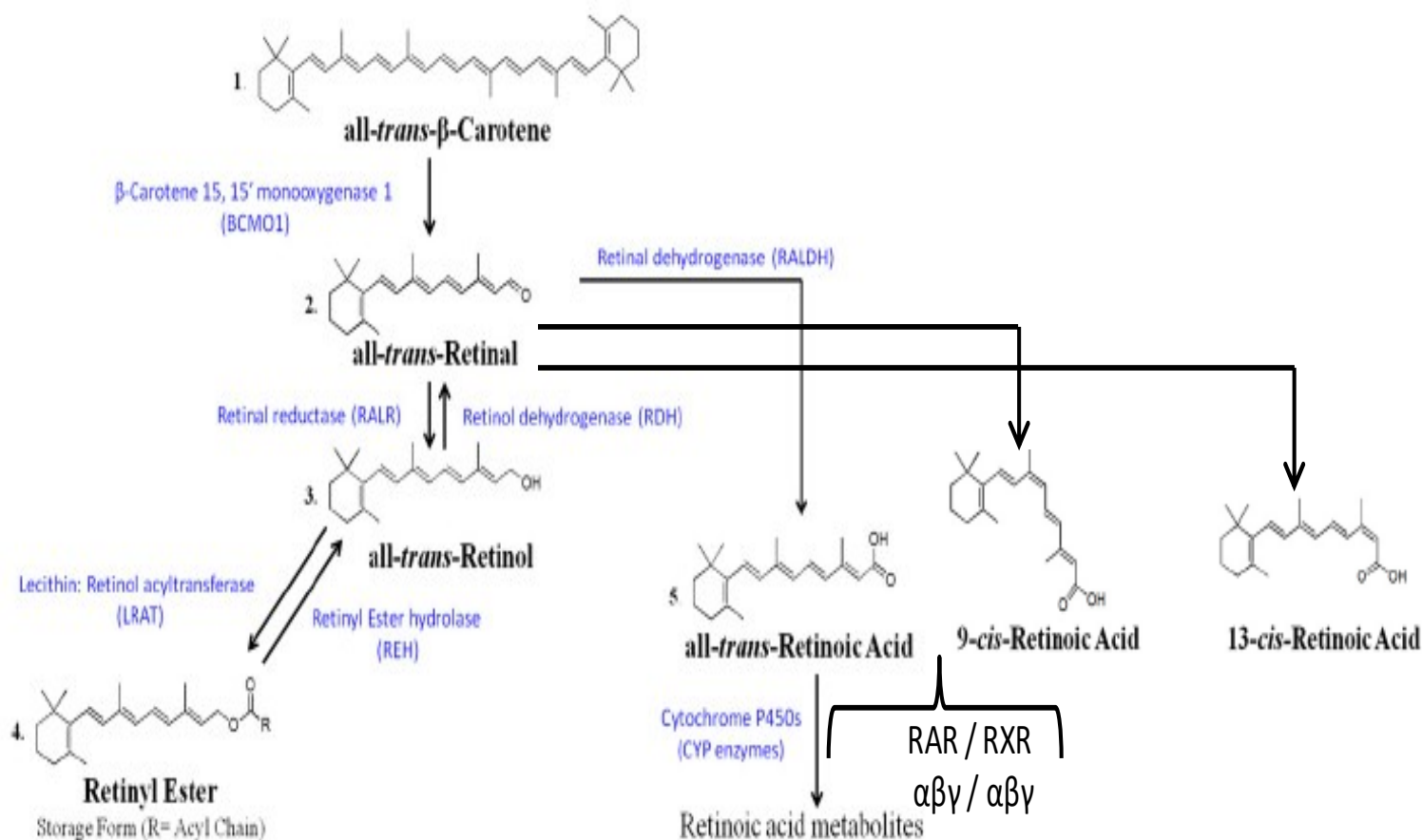


Figure 9: Conversions métabolique intracellulaires des rétinoïdes

(O'Byrne et al 2013, disponible en libre accès, citation en original et adaptations Manolescu DC 2010, 2016 sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme aux règlements de la FESP Université de Montréal; liste d' d'acronymes en début de la thèse)

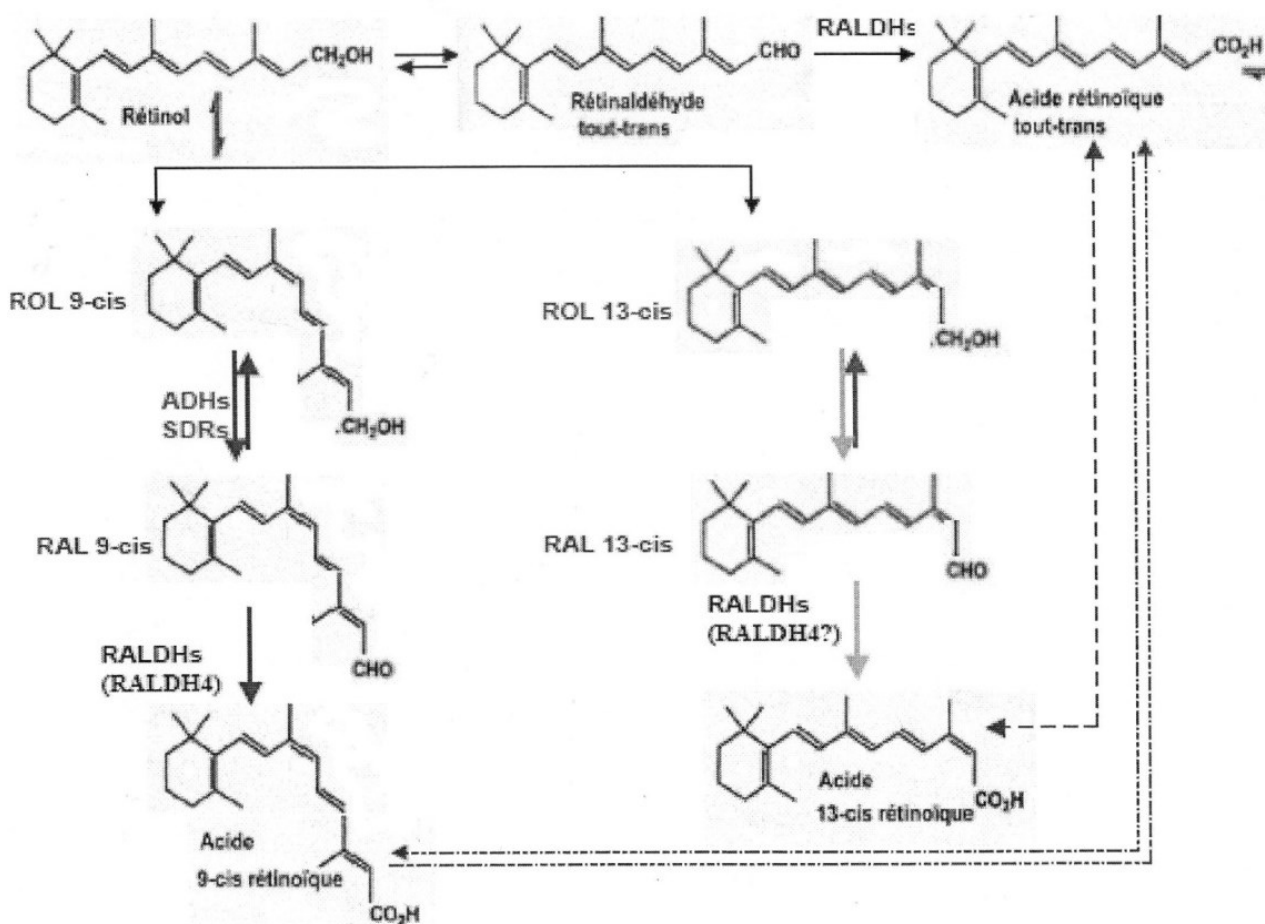


Figure 10. Biosynthèse directe et intermédiaire des isomères de l'AR

(Blaner et al. 2001, disponible en libre accès, citation en original et adaptations Dr. P.V.Bhat, Sima A. 2008 et Manolescu DC 2010 sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme à la FESP-UdeM; liste d'acronymes en début de la thèse)

1.4.2. Enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide rétinolique

1.4.2.1. Oxydation ROL vers RAL. Déshydrogénases MDR/ADH et SDR/RDH

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la double oxydation qui mène du ROL à l'AR. Nous rappelons que la première de ces deux oxydations est réversible (ROL vers RAL) alors que la deuxième (RAL vers AR) est irréversible (Napoli J. L. 2012). Il existe deux catégories d'enzymes impliquées dans la première oxydation du ROL vers RAL, soit 1) les déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne (MDR) représentées par les alcool déshydrogénases (ADH) et 2) les déshydrogénases/réductases courtes (SDR) dont les plus représentatives sont les rétinol déshydrogénases (RDH), (Blomhoff and Blomhoff 2006, Napoli JL.1999, 2012, 2016, Persson et al. 2009). Les ADH sont connus pour leurs capacités à oxyder les alcools en leurs aldéhydes, l'exemple le plus commun étant l'oxydation de l'alcool éthylique

en acétaldéhyde. Elles peuvent donc oxyder le ROL en son aldéhyde, le RAL (Figure 8) (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les ADH sont des enzymes localisées dans le cytoplasme, avec un poids moléculaire d'environ 40 kDa (Parés et al. 2008). Les ADH sont capables de catalyser la réaction d'oxydation du ROL en RAL, mais également la réaction inverse, soit la réduction du RAL en ROL (Napoli J. L. 2012). L'oxydation est dépendante du NAD⁺ (nicotine-amide adénine dinucléotide oxydée) alors que la réduction est dépendante du NADH (nicotine-amide adénine dinucléotide réduit) (Figure 8). Il existe huit classes d'ADH (1-8) chez les vertébrés et chacune présente plusieurs sous-classes et variantes (Blomhoff and Blomhoff 2006). Par exemple, chez l'humain la classe ADH1 comprend 3 isoformes : ADH1A, ADH1B et ADH1C. Ces enzymes présentent une affinité pour les substrats de type *all-trans* ROL. Des études chez des souris ont démontré que les ADH sont exprimées de manière spécifique dans différents tissus (Deltour et al. 1999). La plus efficace pour stimuler l'oxydation du *all-trans* ROL vers *all-trans* RAL est l'ADH4 (Blomhoff and Blomhoff 2006). Des expériences ont été réalisées sur des modèles murins KO pour les enzymes ADH1, ADH3 et ADH4 (Blomhoff and Blomhoff 2006, Molotkov et al. 2002a, Molotkov et al. 2002b, Molotkov and Duester 2003). Elles ont démontré que bien que les trois oxydent le ROL vers RAL, chacune possède des rôles spécifiques dans le processus (Parés et al. 2008). Il y a complémentarité d'action entre ces trois enzymes, selon l'apport de ROL dérivé de la diète. Lorsqu'il y a beaucoup de ROL, c'est ADH1 qui est prépondérante (Duester et al. 2003, Napoli J. L. 2012), cédant la priorité à la ADH3 quand l'apport de ROL est équilibré ou encore à la ADH4 lorsqu'il y a apport diminué de ROL (Blomhoff and Blomhoff 2006, Duester et al. 2003, Parés et al. 2008). Ceci contribue à une meilleure homéostasie du ROL.

Les SDR, dont les rétinoles déshydrogénases (RDH), sont des oxydoréductases importantes sur plusieurs axes métaboliques et sont bien impliquées dans le métabolisme des lipides et dans le processus de la vision (Kavanagh et al. 2008, Napoli J.L. 2012, 2016). Elles sont NADP⁺ dépendantes pour l'oxydation du ROL vers RAL et NADP(H) dépendantes pour la réduction du RAL vers ROL (Figure 8). Les SDR sont plurifonctionnelles et capables de catalyser l'oxydation de plusieurs substrats (Kavanagh et al. 2008). Les SDR responsables de l'oxydation du ROL vers RAL sont les RDH et la réaction est réversible (Duester et al. 2003). Elles sont exprimées dans plusieurs tissus sensibles à la vitamine A, souvent ensemble avec la CRBP-1 (Blomhoff and Blomhoff 2006). La CRBP-1 agit comme un chaperon pour le ROL et

le RAL en les présentant aux RDH, ce qui augmente l'efficacité de la réaction (Everts et al. 2005). Celles-ci sont réparties en plusieurs variantes isoformes (RDH 1 à 14) et (CRAD 1 à 3). Les CRAD veulent dire *cis*-ROL/androgène déshydrogénases. La RDH1 est capable d'oxyder le all-trans-ROL et le 9-cis-ROL (Napoli JL, 2012, 2016). La RDH2 est exprimée davantage dans le foie et est plus impliquée dans la réduction NADPH dépendante du RAL vers le ROL qui sera ensuite estérifié en RE (Kavanagh et al. 2008). Les RDH5, RDH8, RDH10, RDH11 et RDH12 sont impliquées dans l'oxydation du ROL vers le RAL dans le cycle visuel (Napoli J. L. 2012). La RDH10 est spécifique pour le *at*-ROL (Parés et al. 2008). Cette oxydoréductase de la famille RDH/SDR est très importante et conserve 98,6% d'homologie dans la séquence des aminoacides entre la souris et l'humain (Wu B. X. et al. 2002). La RDH10, comme d'autres RDH, fonctionne avec des enzymes spécifiques en cosubstrat (NAD et NADP), et oxyde (NAD⁺ vers NADH) le ROL en rétinaldéhyde (RAL) ou réduit (NADPH to NADP⁺) le RAL en ROL (Figure 8). Importante dans la fonction visuelle et l'embryogenèse, elle l'est aussi pour le métabolisme énergétique car elle est associée à la membrane mitochondriale et/ou les membranes des vacuoles lipidiques (Jiang and Napoli 2013). Les RDH5, RDH10 et RDH11 contribuent à produire le 11-*cis* RAL alors que les RDH8 et RDH12 seront davantage impliquées dans la réduction du *all*-trans RAL (Napoli J. L. 2012). Il existe aussi des SDR sous forme de CRAD. Il y a trois CRAD connus (CRAD1, CRAD2 et CRAD3) capables d'oxyder le ROL en RAL *in vitro* (Blomhoff and Blomhoff 2006, Duester et al. 2003). La CRAD3 contribue plus à la production de 9-*cis* RAL dans les cellules humaines matures. Elle est prépondérante dans le foie et les reins, par rapport aux autres tissus (Zhuang et al. 2002).

1.4.2.2. Oxydation du RAL vers l'AR. Aldéhydes déshydrogénases (ALDH)

Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) ont un rôle important dans la synthèse des acides organiques et également dans la détoxification de l'organisme des aldéhydes métaboliques ou externes (Vasiliou and Nebert 2005). Elles stimulent l'oxydation irréversible des aldéhydes en acides organiques (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les ALDH sont structurées en plusieurs classes, les plus importantes pour le métabolisme des rétinoïdes étant les ALDH de classe 1 (famille ALDH1). Les rétinaldéhydes déshydrogénases (RALDH) font partie en grande majorité de cette classe ALDH1. Ces enzymes catalysent l'oxydation des rétinaldéhydes (RAL) en acide rétinoïque (Napoli J. L. 2012). Il existe quatre RALDH, dont trois appartiennent à la classe

ALDH1 avec comme dénomination (gène/protéine) ALDH1A1/RALDH1, ALDH1A2/RALDH2 et ALDH1A3/RALDH3. La quatrième RALDH est différente et fait partie de la classe ALDH8, étant nommée ALDH8A1/RALDH4 chez la souris, avec une enzyme correspondante faisant partie de la classe 12 (ALDH12A1) chez l'humain. Les RALDH se différencient également par leur activité sur le RAL en fonction de différentes espèces animales (Tableau 2) et par leurs spécificités biologiques. Ainsi la RALDH2 s'exprime de façon précoce dans l'embryon alors que les RALDH1 et RALDH3 suivent plus tard dans le processus de l'organogénèse (Niederreither et al. 2002a).

ALDH	Espèces	Activité pour les substrats de rétinol (RAL)		
		<i>Tout-trans</i>	<i>9-cis</i>	<i>13-cis</i>
RALDH1	Rat	+	+	-
	Souris	+	+	-
	Humain	+	+	+
	Singe	+	+	+
RALDH2	Rat	+	+	+
	Souris	+	+	+
RALDH3	Humain	+	?	?
	Souris	+	-	-
RALDH4	Humain	Trace	+	+
	Souris	Trace	+	+
PB-ALDH	Rat	-	Trace	-
	Souris	-	?	?

Tableau 2 : Activités des RALDHs selon espèces, pour divers substrats de RAL.

(adaptation selon Dr. Pangala V.Bhat / Brodeur H. 2006, adapté par Sima A et Manolescu DC 2010, sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme à la réglementation FESP-Université de Montréal; liste d'acronymes en début de la thèse)

1.4.2.2.1. ALDH1A1 / RALDH1 (RALDH Classe 1 Type 1)

Le gène ALDH1A1 se trouve sur le chromosome 9 chez l'humain (Raghunathan et al. 1988). Sa protéine, la RALDH1, a une masse molaire d'environ 140kDa et possède une similarité de structure interespèces d'environ 70-90% (Penzes et al. 1997a, Penzes et al. 1997b). La RALDH1 est très bien exprimée dans la rétine des embryons et dans plusieurs tissus chez l'adulte, avec prépondérance dans divers tissus épithéliaux, le foie et le rein (Bhat et al. 1998, Blomhoff and Blomhoff 2006). Elle est également présente dans les adipocytes matures. Elle est impliquée dans le maintien de la différenciation des adipocytes et l'absence de RALDH1 augmente le RAL intracellulaire et diminue la formation des adipocytes (Frey and Vogel 2011). Il en résulte une inhibition de l'adipogenèse et de l'obésité (Ziouzenkova O et al. 2007a). Il a été suggéré que la RALDH1 serait davantage mobilisée lors d'une situation d'excès de vitamine A, surtout dans le foie (Blomhoff and Blomhoff 2006, Duester et al. 2003). La RALDH1 est capable d'oxyder les deux isomères *at*-RAL et 9-*cis* RAL vers les isomères d'AR respectifs (Brodeur et al. 2003, Brodeur et al. 2006). Cependant la RALDH1 catalyse mieux le 9-*cis* RAL que le *at*-RAL et l'efficacité augmente lorsque le RAL est lié à la CRBP (Brodeur et al. 2003, Duester et al. 2003). L'expression élevée de la RALDH1 dans le rein de rat à la naissance, indique un rôle pour l'AR dans la maturation, la préservation et le fonctionnement du rein adulte (Bhat et al. 1998). Elle pourrait également jouer un rôle dans l'oxydation de l'isomère 13-*cis* RAL (Brodeur et al. 2003). Des recherches sur des souris transgéniques RALDH1-KO ont révélé un rôle de la complémentarité entre la RALDH1 et les autres RALDH 2, 3 et 4 dans la synthèse d'AR dans différents tissus (Blomhoff and Blomhoff 2006, Duester et al. 2003). En plus de son rôle dans la production d'AR, la RALDH1 est impliquée dans le métabolisme de l'alcool. Le Tableau 2 montre les activités du RALDH1 comparativement aux autres RALDH, selon les espèces et pour divers substrats de RAL.

1.4.2.2.2. ALDH1A2/ RALDH2 (RALDH Classe 1 Type 2)

La RALDH2 fait également partie de la classe (famille) 1 des ALDH. Elle a pour la première fois été clonée à partir de testicules de rat (Napoli J. L. 2012). Elle est largement exprimée dans plusieurs tissus et est active en complémentarité avec la RALDH1 (Napoli JL. 2012). Elle est la première RALDH exprimée dans l'embryon de souris à l'âge précoce de sept jours (Zhao et al. 1996). Elle est également bien exprimée dans plusieurs tissus chez l'adulte, avec une dominance

dans les testicules et organes sexuels (Napoli J. L. 2012). Le gène ALDH1A2 se trouve sur le chromosome 15 chez l'humain et 9 chez la souris. Sa structure partage environs 70-90% des structures des autres RALDH intra et inter-espèces. La RALDH2 est capable d'oxyder le *at*-RAL, le 9-*cis* RAL et le 13-*cis* RAL vers les isomères de l'AR respectifs mais avec une préférence pour le *at*-RAL (Gagnon et al. 2002). L'expression de la RALDH2 dans les tissus de l'embryon de souris coïncide avec la présence de l'AR dans les mêmes tissus, ce qui atteste la fonctionnalité de la RALDH2 (Niederreither et al. 2002a). Les embryons de souris RALDH2-KO n'ont tout simplement pas d'AR dans leurs corps, et leur organogenèse s'arrête avec la mort intra-utérine à l'âge de dix jours (Napoli J. L. 2012). Un traitement précoce avec de l'AR permet à ces embryons de continuer à se développer (Blomhoff and Blomhoff 2006). La RALDH2 est donc essentielle pour le bon développement de l'embryon et son absence affecte le développement de tous les organes et engendre la mort de l'embryon (Blomhoff and Blomhoff 2006). Chez les rongeurs adultes, la spermatogenèse est dépendante de la RALDH2 car il y a dominance de son expression dans les spermatocytes (Napoli J. L. 2012, Zhai et al. 2001). Une diète appauvrie en vitamine A peut provoquer une diminution de l'expression (mRNA) de RALDH2 dans ces cellules (Napoli J. L. 2012). La RALDH2 semble également avoir un rôle préférentiel dans le développement rénal (El Kares et al. 2010). Le Tableau 2 montre l'activité du RALDH2 comparativement aux autres enzymes RALDH pour divers substrats de RAL.

1.4.2.2.3. ALDH1A3/RALDH3 (RALDH Classe 1 Type 3)

D'abord clonée à partir de glandes salivaires humaines, la RALDH3 est exprimée dans les embryons de souris et poulets, dans la rétine, dans le système respiratoire, dans les bourgeons urémiques et dans les rudiments cérébraux (Blomhoff and Blomhoff 2006, Mic et al. 2000). Chez l'humain, la RALDH3 est bien exprimée dans la majorité des tissus avec une dominance dans les reins, les glandes mammaires, l'estomac et les glandes salivaires (Hsu et al. 1994). La RALDH3 se trouve sur le chromosome 15 chez l'humain (Hsu et al. 1994). Sa structure partage environs 70-90% des structures des autres RALDH. Dans l'embryon déjà, la RALDH3 est fonctionnelle et produit de l'AR à partir du *at*-RAL qui est son substrat préférentiel (Graham CE et al. 2006a). Cependant la RALDH3 est la seule des RALDH1, 2, 3 qui ne reconnaît pas le 9-*cis* RAL comme substrat (Sima et al. 2009). Ceci indique la complémentarité d'action entre ces enzymes RALDH1, RALDH2, RALDH3 et RALDH4 à produire divers isomères d'AR (*at*,

9-*cis*, 13-*cis*) nécessaires à l'organisme à partir des substrats respectifs de RAL (*at*, 9-*cis*, 13-*cis*) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Niederreither et al. 2002b, Niederreither et al. 2002a). Les souris RALDH3-KO meurent par asphyxie, dix heures après leur naissance, à cause de la non-ouverture des narines et de la bouche (atrésie naso-buccale) (Napoli J. L. 2012). Cette situation peut être prévenue avec un traitement à l'AR (*at*) de la mère porteuse, ce qui atteste l'importance de la RALDH3 pour ces organes (Blomhoff and Blomhoff 2006). La RALDH3 semble générer du *at*-AR pour maintenir la différenciation cellulaire dans les épithéliums mammaires, ce qui supprime la tumorigénèse. Dans des cultures primaires de cellules épithéliales mammaires saines, les RALDH3 catalysent la conversion du ROL en RAL et en *at*-AR, mais pas dans des cellules tumorales (Mira-Y-Lopez et al. 2000). D'autres études ont associé l'expression de la RALDH3 à la tumorigénèse (Marcato P et al 2011). Pour expliquer cette contradiction, l'équipe de Napoli et ses collaborateurs suggèrent des mécanismes compensatoires pour l'expression augmentée de la RALDH en présence d'une fonctionnalité réduite de la protéine dans la carcinogénèse, ou encore des non-concordances méthodologiques (Napoli J. L. 2012). Une expression très élevée de la RALDH3 a été trouvée dans le pancréas de certains modèles de souris diabétiques (ex. : db/db, ou rendues obèses par une diète riche en gras –HFD « *high fat diet* ») et a été associée à une diminution de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (Shimamura et al. 2010). Ces souris avaient un niveau d'expression (mRNA) de RALDH3 dans le pancréas, neuf fois plus élevé comparativement à des souris normales. Le mécanisme est toujours à l'étude mais ces données confirment l'importance des rétinoïdes dans la fonction de divers organes (Napoli JL 2012, 2016). Le Tableau 2 montre les activités de la RALDH3 et autres enzymes RALDH par espèce, et divers substrats de RAL.

1.4.2.2.4. ALDH8A1/RALDH4 (RALDH Classe 8 Type 4)

À la différence des trois autres RALDH qui font partie de la famille (classe) 1, la RALDH4 fait partie de la famille (classe) 8 (Sophos and Vasiliou 2003). Cette enzyme catalyse faiblement l'oxydation des *at*-RAL et 13-*cis* RAL, mais très bien l'oxydation du 9-*cis* RAL (deux fois plus). Elle est très bien exprimée dans le foie et les reins adultes. Plusieurs équipes ont démontré son affinité pour l'oxydation de 9-*cis* RAL (Sima et al. 2009, Lin et al. 2003). Il a donc été proposé que la RALDH4 soit impliquée dans la synthèse de 9-*cis* AR *in vivo* (Blomhoff and Blomhoff, 2006). La présence dans le rein de rat de substrats de 9-*cis* ROL et 9-*cis* RAL et

la présence d'une enzyme qui catalyse efficacement le 9-*cis* RAL vers 9-*cis* AR sont compatibles avec cette hypothèse (Labrecque et al. 1995). Le gène ALDH8A1 se trouve sur le chromosome 6 humain et 10 pour la souris. Le fait qu'elle est exprimée tôt dans le foie et le cortex rénal embryonnaire de la souris, suggère que la RALDH4 joue un rôle important dans l'organogenèse (Lin et al. 2003). L'enzyme a été également étudiée pour sa capacité à fournir du 9-*cis* AR, y compris dans les reins adultes (Lin et al. 2003).

1.4.3. Oxydation catabolique de l'AR - Cytochromes CYP26 / Groupe P450

Après avoir accompli son rôle biologique l'AR doit être dégradé pour éviter une accumulation toxique dans les cellules. Des enzymes CYP26 de la superfamille P450 oxydent l'AR (Figure 11) en métabolites polaires (ex.: 4-OH-AR, 5,6-époxy-AR, 4-oxo-AR) qui seront ensuite éliminés dans l'urine (Blomhoff and Blomhoff 2006, Reijntjes et al. 2005). Quatre sous-familles des enzymes CYP26 ont été investiguées : **CYP26A1** (Lampen et al. 2001, Ray et al. 1997, White et al. 1998); **CYP26B1** (MacLean et al. 2001, White et al. 2000); **CYP26C1** (Reijntjes et al. 2004, Tahayato et al. 2003, Taimi et al. 2004); **CYP26D1** (Gu X et al. 2005). Les conditions d'expression des **CYP26A1**, **CYP26B1**, **CYP26C1**, **CYP26D1** diffèrent et sont spécifiques aux quatre enzymes, suggérant des rôles individuels spécifiques pour chacune (Reijntjes et al. 2004). L'expression et l'activité de ces quatre enzymes sont contrôlées en rétroaction par l'AR, un excès cellulaire d'AR déclenchant leur expression et activation (Blomhoff and Blomhoff 2006). Ceci implique une rétroaction de réponse directe, suite à la capacité des gènes **CYP26A1 ; B1 ; C1 et D1** à détecter la variation des concentrations cellulaires d'AR (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les CYP26 sont présentes dans divers tissus, autant dans l'embryon que chez l'adulte, avec une expression plus importante pour les CYP26A1 et CYP26B1. Des souris CYP26A1-KO meurent dans l'utérus, avec des malformations typiques d'un surplus tératogène d'AR, ce qui atteste l'importance de cette enzyme (Abu-Abed et al. 2001, Sakai et al. 2001). Ce sont de graves malformations (ex. : spina-bifida) souvent létales, de l'axe antéropostérieur de l'embryon, du cerveau, de la colonne vertébrale, des reins et des intestins. L'expression de la CYP26A1 est stimulée lors d'une diète particulièrement riche en vitamine A (Yamamoto et al. 2000). La CYP26B1 possède la même activité que la CYP26A1. Elle est présente dans la plupart des tissus en complémentarité avec la CYP26A1, mais avec une expression prédominante dans le cerveau chez l'adulte, dont le

cérébellum (White et al. 2000). La CYP26C1 peut aussi dégrader le *at*-AR de la même façon que les CYP26A1 et CYP26B1, toutefois elle est plus efficace sur le 9-*cis* AR. Son expression n'est pas aussi répandue chez l'adulte que les deux autres, tous tissus confondus, mais de grandes quantités d'AR vont provoquer son expression (Blomhoff and Blomhoff 2006). Lorsque l'AR à dégrader est lié à des transporteurs CRABP, les enzymes CYP26 sont plus efficaces à catalyser son oxydation en métabolites polaires (Boylan JF and Gudas 1992a). Les CYP26 sont essentielles pour la gestion optimale de l'AR dans les cellules et, par le fait même, exercent une influence indirecte sur plusieurs gènes régulés par l'AR (Blomhoff and Blomhoff 2006). En complémentarité avec le catabolisme de l'AR par les CYP26, il peut y avoir un catabolisme direct du ROL, par d'autres mécanismes, dans les situations où il y a un excès de vitamine A dans la diète (Blomhoff and Blomhoff 2006)

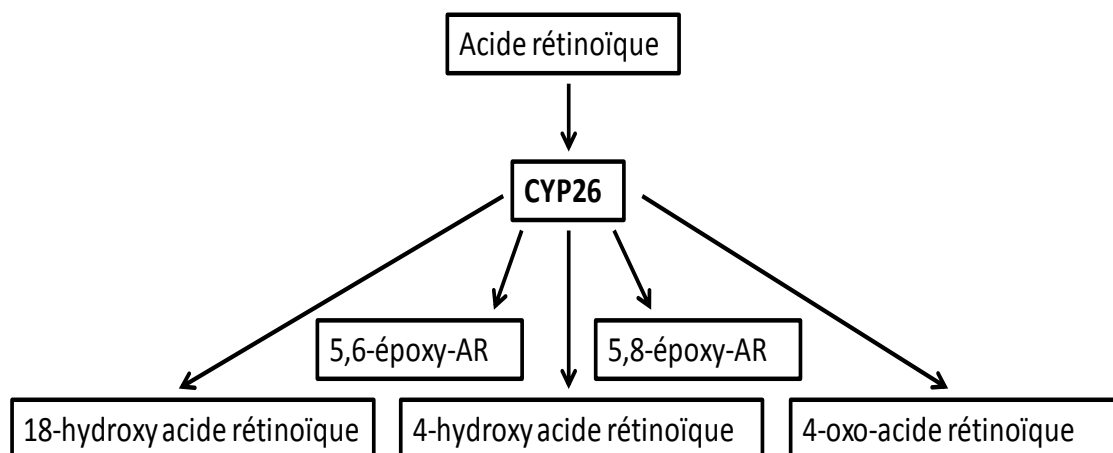


Figure 11. CYP 26 dans le catabolisme de l'acide rétinoïque

(Manolescu DC 2017, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme aux règlements FESP-Université de Montréal; liste d'acronymes en début de la thèse)

1.4.4 RAR et RXR, récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque (AR) est une forme biologiquement très active de la vitamine A. Il se lie à ses récepteurs nucléaires attitrés (les RAR et les RXR; des phosphoprotéines) pour contrôler la transcription des gènes dépendants, soit par l'activation soit par la répression (Blomhoff and Blomhoff 2006, Davidovici et al. 2007). Afin de pénétrer dans le noyau, l'AR se lie d'abord à sa protéine de transport cytoplasmique, la CRABP. Ce complexe passe la membrane nucléaire par diffusion passive, grâce à ses propriétés liposolubles. Dans le noyau le complexe se dissocie;

la CRABP est recyclée et repasse dans le cytoplasme, tandis que l'AR se lie à ses récepteurs nucléaires RAR et/ou RXR (Plet A, 1988). En 1987 a été découvert un premier récepteur d'AR, le RAR α qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires hormonaux de type 2 (Giguere et al.1987, Petkovich M et al.1987). Ensuite, deux autres isomères (RAR β et RAR γ) ont été identifiés par les mêmes équipes. Autant pour les RAR que pour les RXR, il existe trois isomères, soit α , β et γ (Blomhoff and Blomhoff 2006, Petkovich M 1992, Szanto et al. 2004). Sans entrer dans les détails, mentionnons que chaque sous-type possède aussi plusieurs isoformes. Les sous-types α , β , γ des RAR et RXR sont codés par des gènes différents (Almasan et al.1994, Blomhoff and Blomhoff 2006). Les RAR et RXR sont bien exprimés dans les tissus embryonnaires et chez l'adulte, ce qui atteste leur importance (Chambon P. 2004,2005, Blomhoff and Blomhoff 2006). La structure générale des RAR et RXR (Figure 13) est formée de quatre (4) régions : **A/B**-Modulateur, **C**-(DNA *Binding Domaine* ou DBD/liaison à l'ADN), **D**-(charnière souple entre les domaines C et E), et **E**-(*Ligand Binding Domaine* ou LBD / liaison au ligand) (Shulman and Mangelsdorf 2005, Sonoda et al. 2008). Lorsque liés par un complexe corépresseur (Blomhoff and Blomhoff 2006, McGrane 2007), et en absence de ligand, les récepteurs nucléaires fonctionnent comme des répresseurs et bloquent la transcription des gènes (Shulman and Mangelsdorf 2005). Lorsque liés par un complexe coactivateur (Blomhoff and Blomhoff 2006, McGrane 2007), et en présence de leur ligand spécifique, les récepteurs nucléaires fonctionnent comme activateurs et permettent la transcription génique (Shulman and Mangelsdorf 2005). Les RAR et RXR font partie de la sous-famille de récepteurs nucléaires hormonaux de type 2, avec les récepteurs pour hormones thyroïdiennes (TR), les récepteurs pour la vitamine D3 (VDR), pour les PPAR (Aranda and Pascual 2001, McGrane 2007, Sonoda et al. 2008). Les récepteurs nucléaires hormonaux de type 2 se caractérisent par le fait qu'ils peuvent se lier à leurs éléments de réponse (RE) - une répétition directe de six nucléotides (Figures 12 et 14) - même en absence de leur ligand spécifique.

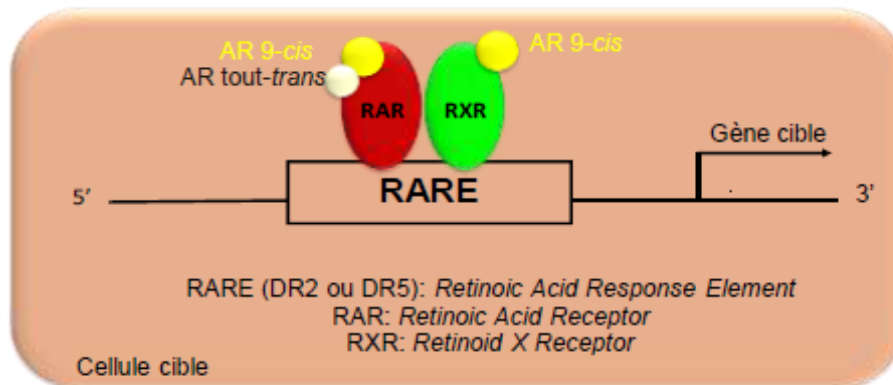


Figure 12. Régulation génique par l'AR via les récepteurs RAR, RXR et éléments RARE

(Gracieuseté de Sima Aurélie, Cours Vitamine A 2015, NUT6638 Nutrition/UdeM, disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, selon la politique FESP Université de Montréal)

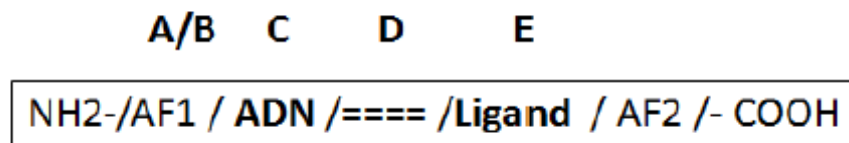


Figure 13. Structure des récepteurs à l'AR (RAR et RXR), Manolescu DC 2017.

1.4.5. Fonctionnement des récepteurs nucléaires de l'AR

Le 9-*cis* AR est capable de lier les deux types de récepteurs nucléaires (RAR et RXR), alors que le *at*-AR ne peut lier que les récepteurs RAR (Figure 12) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Soprano et al. 2004). Ces récepteurs vont se coupler ensuite aux éléments RARE et/ou RXRE et moduler la transcription des gènes soit par répression, soit par activation, selon le cas (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les RAR peuvent former des tandems (RAR/RXR) seulement avec les RXR alors que ces derniers peuvent former des homodimères RXR/RXR ou des hétérodimères avec une grande variété de récepteurs nucléaires étrangers aux rétinoïdes (ex.: RXR/VDR, RXR/Thyroïde R, RXR/PPAR) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Davidovici et al. 2007, Ziouzenkova O et al. 2007c, Ziouzenkova O and Plutzky 2008). Les hétérodimères formés par les RXR avec d'autres récepteurs nucléaires peuvent parfois fonctionner seulement avec le ligand spécifique pour le récepteur étranger (ex.: VDR, TR, PPAR) à condition toutefois que le ligand en question se trouve en quantité suffisante. Quand le ligand de récepteur étranger se trouve en trop petite quantité, le 9-*cis* AR a une action compensatoire et peut faire fonctionner quand même le tandem formé par le RXR avec l'autre récepteur, en se liant au RXR.

Les hétéro-dimérisations avec les RXR peuvent être permissives ou non permissives. Dans une hétéro-dimérisation permissive des RXR avec un autre récepteur, l'hétérodimère peut être activé par l'un ou l'autre des ligands des membres de l'hétérodimère. C'est le cas du RXR qui peut former l'hétérodimère RXR/PPAR (Shulman and Mangelsdorf 2005, Sonoda et al. 2008, Ziouzenkova O and Plutzky 2008). Dans une hétéro-dimérisation non permissive des RXR avec un autre récepteur nucléaire, (ex.: RXR/RAR, RXR/TR, RXR/VDR) l'hétérodimère ne fonctionne pas seulement avec le ligand du RXR (Shulman and Mangelsdorf 2005, Sonoda et al. 2008). Un tel hétérodimère fonctionnera soit avec le ligand du récepteur partenaire du RXR, soit avec les deux ligands (pour RXR et pour son partenaire). Un bon exemple est l'hétérodimère RXR/RAR. Dans ces cas le RXR est subordonné à son partenaire dans une hétéro-dimérisation non permissive. Il est donc « silencieux » par rapport à son partenaire. Ce phénomène de subordination des RXR, fait en sorte que dans un hétérodimère non permissif, la voie de signalisation du partenaire dominant du RXR sera prioritaire. La cause de subordination du RXR (dans le tandem RXR/RAR par exemple) réside dans le fait que le ligand du RXR, de façon individuelle, ne peut pas enlever le corépresseur qui chapeaute le tandem RXR/RAR (Shulman and Mangelsdorf 2005). Cela empêche le coactivateur de venir chapeauter le tandem RXR/RAR pour initier la transcription du gène (Shulman and Mangelsdorf 2005). A titre d'exemple, les RAR, TR, VDR, sont des récepteurs qui dominent le RXR dans une hétéro-dimérisation non permissive (RXR/RAR, RXR/TR, RXR/VDR) (Shulman and Mangelsdorf 2005, Sonoda et al. 2008). Par leurs dimérisations, les RXR sont largement impliqués dans plusieurs voies métaboliques dans l'organisme (Rastinejad 2001, Shulman and Mangelsdorf 2005, Sonoda et al. 2008). L'hétérodimère RXR/PPAR est une cible thérapeutique dans le syndrome métabolique et le diabète de type 2, et les PPAR sont très impliqués dans le métabolisme des lipides et en général chez les mammifères (Rosen and Spiegelman 2001, Sonoda et al. 2008, Ziouzenkova O and Plutzky 2008). Le Tableau 3 montre quelques hétérodimères communs formés par les RXR.

Hétérodimère	Ligand	Activation/répression transcriptionnelle	Fonctions physiologiques	DR _i
TR/RXR	hormone thyroïdienne	activation	croissance	4
PPAR/RXR	9- <i>cis</i> AR	activation	contrôle du métabolisme lipidique et glucidique	1
VDR/RXR	vitamine D	activation	croissance, physiologie osseuse	3
COUPTFII/RXR	9- <i>cis</i> AR	répression	inhibe la voie de signalisation de l'AR	1
et				
tout- <i>trans</i> AR				

Tableau 3. Quelques hétéro-dimères communs formés par les RXR

(selon laboratoire Dr. Pangala V.Bhat / Gagnon I. 2002, Manolescu DC 2010; disponible en libre accès, citation sans préjudice aux droits d'auteurs, selon la politique FESP Université de Montréal)

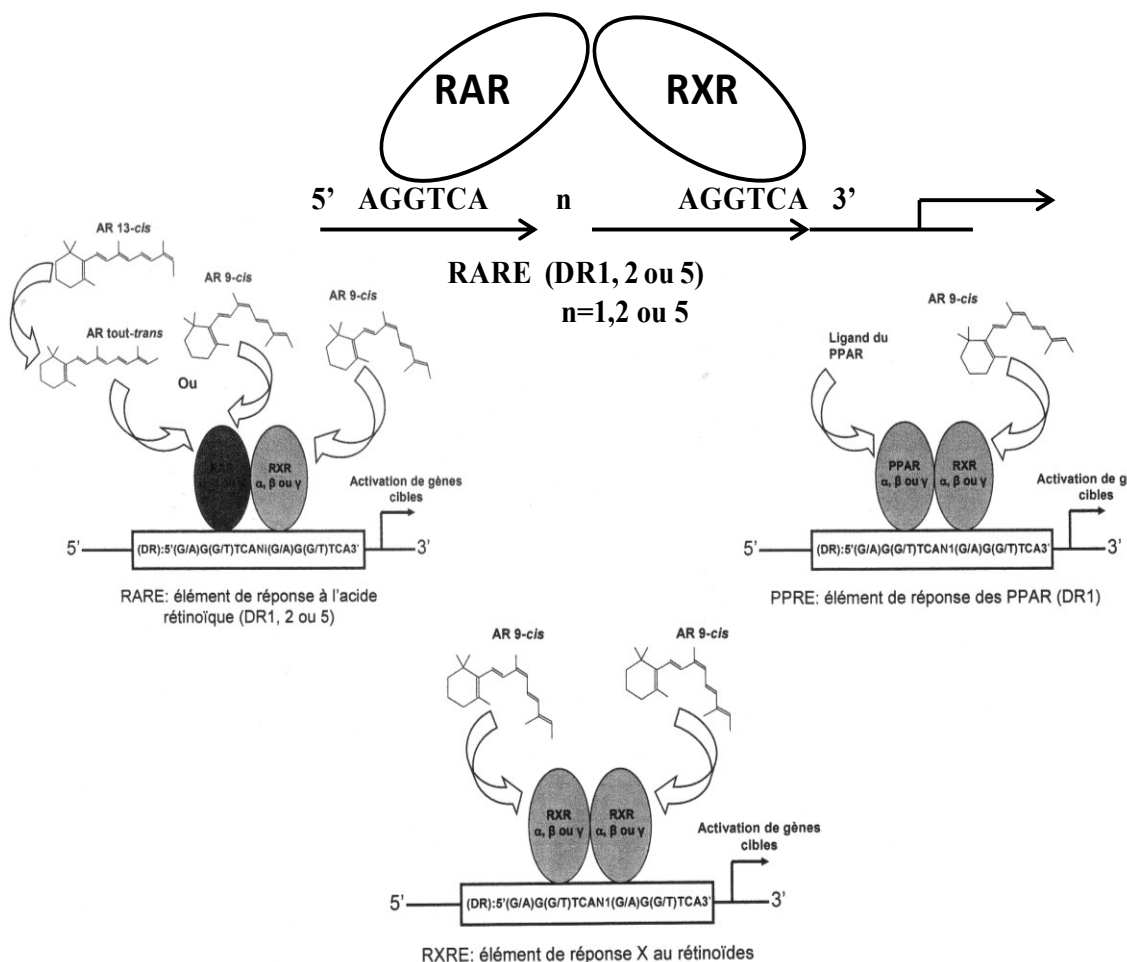


Figure 14. Dimères RAR/RXR, PPAR/RXR et RXR/RXR, et éléments de réponse

(laboratoire Dr. Pangala V.Bhat /Gagnon I. 2002 /Manolescu DC 2010, 2017, disponible en libre accès, citation sans préjudices aux droits d'auteurs, selon la politique FESP Université de Montréal; liste globale d'acronymes disponible en début de la thèse)

1.4.6. Éléments de réponse aux récepteurs à l'AR (RARE et RXRE)

Les structures de réponse aux récepteurs à l'AR, appelées RARE (« *retinoic acid response elements* ») et RXRE (« *retinoid X response elements* ») ressemblent aux autres HRE (« *hormone response elements* ») basés sur deux répétitions d'hexa-nucléotides AGGTCA séparées par un nombre « *n* » de nucléotides (Figure 14) (Sonoda et al. 2008). C'est de ces HRE que le domaine central des récepteurs nucléaires (« DBD/DNA-binding domain ») va se lier par deux doigts de zinc (Sonoda et al. 2008). Pour les éléments de réponse aux récepteurs à l'AR, les répétitions sont majoritairement directes (DRn) des deux fragments d'ADN majoritairement de type 5'-AGGTCA-3' séparées par un nombre « *n* » de nucléotides (Blomhoff and Blomhoff 2006) (Figure 14). Pour des RARE avec n=2 ou 5 on parle de DR2 ou DR5, alors que pour les RXRE avec n=1 on parle de DR1. Donc les HRE pour les récepteurs nucléaires de type 2 (ex. : RAR, PPAR, TR, VDR) se ressemblent et sont formés par deux répétitions directes (DRn) du fragment 5'-AGGTCA-3' séparées par un nombre « *n* » de nucléotides. Par exemple n=1 pour PPRE, n=1 pour RXRE, n=2 ou 5 pour RARE (Figure 14). Les tandems hétérodimères (ex. : RXR/RXR, RXR/PPAR, RXR/TR, RXR/VDR) ainsi que les homodimères RXR/RXR, vont se coupler à leurs éléments de réponse (ex. : RARE, RXRE, PPRE) qui se trouvent sur les promoteurs des gènes cibles. Ainsi le RXR et ses récepteurs nucléaires partenaires de dimérisation, reconnaîtront les éléments de réponse avec les deux séquences AGGTCA arrangées en tandem (Rastinejad 2001). Une bonne caractérisation comparative des RARE peut être trouvée aussi dans la revue de Balmer and Blomhoff 2005. En bref, un hétérodimère RAR/RXR peut reconnaître des éléments de réponse RARE/RXRE ayant en leurs structures des espacements de 2, 5 ou 1 nucléotides respectivement (DR2, DR5, DR1) alors qu'un homodimère RXR/RXR reconnaîtra seulement les éléments de réponse avec 1 nucléotide d'espacement (DR1) (Figure 14).

L'expression même de certains isomères RAR (ex : RAR α) peut être dépendante d'un RARE se trouvant sur leur promoteur (Leroy et al. 1991). Les espacements de 1, 2 ou 5 nucléotides (DR1, DR2 ou DR5) entre les répétitions directes (DR) type 5'-AGGTCA-3' des éléments de réponse RARE et RXRE ou autres RE (response elements), agissent comme éléments identitaires et influencent la spécificité d'accouplement des dimères (ex : RXR/RXR, RAR/RXR, TR/RXR) à l'élément de réponse spécifique sur les promoteurs de gènes (Rastinejad

2001). Toutefois la simple présence d'un RXR dans plusieurs dimères (ex :RXR/TR, RXR/VDR, RXR/PPAR) ne veut pas dire que ces gènes seront transcrits par l'AR via le RXR. Tel que décrit plus haut, cela dépend du caractère permissif ou non permissif de la dimérisation, le RXR pouvant influencer grandement la transcription seulement avec son ligand (ex.9-*cis* AR) dans les dimérisations permissives (ex: RXR/PPAR)(Sonoda et al. 2008). Dans divers dimères, le RXR est placé sur le demi-site en 5' d'un élément de réponse alors que ses partenaires de dimérisation sont placés sur le demi-site en 3'. Cependant, pour un élément de réponse DR1 et le dimère RAR/RXR, la situation (polarité) est contraire, le RAR étant en 5' et le RXR étant en 3' (Rastinejad et al. 2000). Il peut arriver que le promoteur d'un gène contient deux éléments de réponse à l'acide rétinoïque de type RARE, comme c'est le cas pour PEPCK (Scott DK et al. 1996). Dans ces cas, chaque RARE a son propre DRn.

1.4.7. Actions génomiques indirectes et actions non génomiques de l'AR

Nous avons vu précédemment l'action génomique directe de l'AR sur l'expression de gènes. L'acide rétinoïque manifeste également des effets non médiés par ses récepteurs nucléaires directs RAR et RXR et leurs éléments de réponse RARE et RXRE. Il est donc possible pour l'AR d'avoir une action génomique indirecte sur certains gènes. Un gène qui ne possède pas des RARE sur son promoteur peut être dépendant de cofacteurs d'expression qui eux, ont des RARE sur leur promoteur, étant donc dépendants de l'AR (Balmer and Blomhoff 2002). Ainsi l'AR peut moduler l'expression de gènes via d'autres facteurs de transcription, tels que les PPAR. Le *at*-AR (mais pas le 9-*cis* AR) est un ligand de haute affinité pour PPAR β/δ (mais pas pour PPAR α et PPAR γ) activant sa transcription (Shaw N et al. 2003). L'AR a aussi des effets non génomiques, comme la modulation de l'activité de plusieurs protéines kinases, importantes dans le métabolisme énergétique. Par exemple, l'exposition à l'AR active rapidement (par phosphorylation) la p38 MAPK (« *p38 mitogen-activated protein kinase* ») dans le gras (Teruel T 2003) et dans les muscles (Lee Y.M. 2008). Ceci mène (entre autre) à l'augmentation de l'expression des UCP1 par l'AR en cultures des adipocytes (Mercader J 2010) et à l'augmentation de la captation de glucose en cultures cellulaires de muscles squelettiques (Lee Y.M. 2008). Il a été également démontré que l'AR augmente la production de NO dans des cellules endothéliales, par la phosphorylation d'eNOS, jouant ainsi un rôle bénéfique pour l'endothélium vasculaire (Urano et al. 2005). L'isomère 13-*cis* de l'AR n'a pas de récepteur

nucléaire et ne peut contrôler l'expression des gènes, mais il influence indirectement la peau (Blaner WS 2001, Thielitz et al. 2008). Une analyse des situations d'influence non génomiques de l'AR sur divers aspects biomoléculaires (ex. rétinoylation) se trouve dans une bonne revue de Blomhoff et collaborateurs (Blomhoff and Blomhoff 2006).

1.5. VITAMINE A : ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET CLINIQUES

1.5.1. La vitamine A et le cycle de la vision

L'implication majeure de la vitamine A dans la vision, est une fonction largement connue de cette vitamine. Elle exerce cette fonction dans l'œil, en tant que ROL et RAL (non pas l'acide rétinoïque) dans une sorte de «dialogue» entre des cellules pigmentaires épithéliales (RPE) et des cellules photosensibles de la rétine (Figure 15) (Parker and Crouch 2010). Le rétinol participe aussi à la synthèse de glycoprotéines nécessaires à l'intégrité de la cornée. (Blomhoff and Blomhoff 2006). Une carence chronique de vitamine A va affecter gravement la vision. Une baisse de la vision est alors remarquée à l'aube, au crépuscule et durant la nuit, quand la quantité de lumière est réduite. Avec des sensibilités diverses à la quantité de lumière, tous les vertébrés possèdent un cycle visuel tributaire de la vitamine A (Baehr et al. 2003). Le cycle visuel des rétinoïdes débute avec l'isomère 11-*cis*-RAL qui passe des cellules épithéliales pigmentaires (RPE) de la rétine dans les cellules réceptrices de lumière, pour s'unir à l'opsine et former la rhodopsine de couleur mauve (Figure 15) (Parker and Crouch 2010). Le 11-*cis* RAL est à la base de la synthèse de rhodopsines qui permettent la vision crépusculaire et des iodopsines qui se trouvent dans les cônes de la rétine, et permettent la vision des formes et des couleurs (Blomhoff and Blomhoff 2006). L'unité 11-*cis* RAL/opsine (rhodopsine mauve) est extrêmement sensible à la lumière, et va s'isomériser en *all-trans*-RAL/opsine jaune (Figure 15) (Baehr et al. 2003, Blomhoff and Blomhoff 2006, Parker and Crouch 2010, Wolf 2001). Ensuite il y aura dissociation du *at*-RAL de l'opsine et, sous l'influence de l'enzyme SDR, le *at*-RAL sera réduit en *at*-ROL (Figure 15) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Parker and Crouch 2010). Le *at*-ROL passe ensuite de cellules photo-réceptrices dans les cellules épithéliales pigmentaires (RPE) pour y être d'abord estérifié (RE) par l'enzyme LRAT (Baehr et al. 2003). Sous l'influence de l'enzyme RPE65 (isoméro-hydrolase) les RE sont hydrolysés en ROL qui sera instantanément isomérisé en 11-*cis*-ROL (Figure 15) (Baehr et al. 2003, Blomhoff and Blomhoff 2006, Parker and Crouch 2010). Ceci ferme le cycle visuel de la vitamine A. Un

nouveau cycle démarre lorsque, lié au transporteur CRALBP, le 11-*cis* ROL est oxydé, sous l'influence des enzymes RDH5 et RDH11, en 11-*cis* RAL qui va passer des cellules épithéliales pigmentaires (RPE) dans les cellules photo-réceptrices pour y continuer le cycle (Figure 15) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Parker and Crouch 2010, Wolf 2001). Un manque d'acuité visuelle, dans les moments de pénombre ou la nuit, peut signifier une déficience importante des réserves hépatiques de vitamine A et doit inciter à une vérification de la vitamine A circulante. Si carence il y a, il est urgent d'y remédier par une supplémentation en vitamine A, sinon il y a danger de kératinisation des tissus dans l'œil (conjonctive, cornée) avec apparition de signes de dégénérescence nommés « taches de Bitôt » (Blomhoff and Blomhoff 2006).

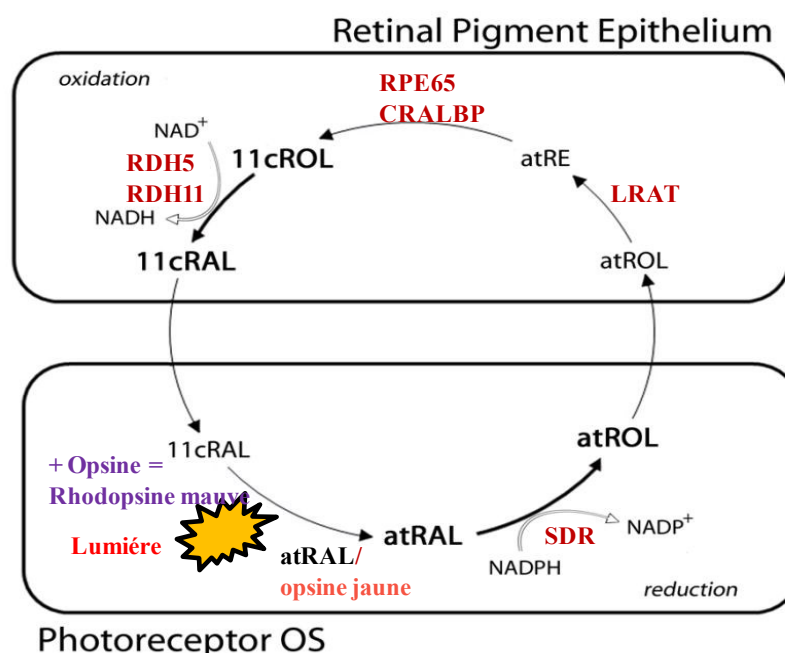


Figure 15. Cycle visuel des rétinoïdes

(adapté de Parker RO and Crouch RK 2010, disponible en libre accès, citation en original et adaptations Manolescu DC 2017 sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme FESP UdeM; liste d'abréviations en début de la thèse)

1.5.2. Vitamine A et santé épithéliale

Dans les carences majeures et prolongées en vitamine A, plusieurs tissus épithéliaux (ex. : peau, membranes des organes internes) s'en ressentent. En plus d'être asséchés et sclérosés, ces tissus se retrouvent perturbés non seulement dans leurs fonctions protectrices mais également dans leurs fonctions sécrétrices (Blomhoff and Blomhoff 2006). De tels dommages peuvent devenir irréversibles, mais il est possible d'y remédier par un apport externe de

rétinoïdes. Cela par des apports alimentaires augmentés certes, mais il existe aussi des suppléments en gélules. Il existe également des crèmes topiques ou des préparations liquides pour traiter diverses maladies tégumentaires comme le psoriasis, les taches brunes ou encore l'acné rebelle (Blomhoff and Blomhoff 2006, Moise et al. 2007).

1.5.3. Vitamine A, immunité et cancers

Des tissus épithéliaux malades, sont autant de portes d'entrée pour les agents infectieux, ce qui surcharge le système immunitaire (Stephensen 2001). Les carences en vitamine A ont été souvent associées à une incidence augmentée de maladies infectieuses telles que la diarrhée et autres infections gastro-intestinales, les infections oto-rhino-laryngologiques (ORL) et celles des voies respiratoires et uro-génitales (Stephensen 2001, Blomhoff and Blomhoff 2006). Les carences en vitamine A, sont associées à des systèmes immunitaires de faible qualité, à des lymphocytes peu efficaces contre divers virus ou encore des macrophages avec faible capacité de phagocytose. La production des anticorps et des cytokines ou encore la maturation des lymphocytes, peuvent également être perturbées (Blomhoff and Blomhoff 2006, Stephensen 2001, Villamor and Fawzi 2005). Des épithéliums fragilisés par des carences en vitamine A, sont à risque élevé pour le développement de cancers. Au niveau biomoléculaire, des altérations dans le métabolisme et transformations de rétinoïdes ou encore au niveau des récepteurs à l'AR augmentent le risque d'apparition de certains cancers. Le cas de la leucémie aiguë promyélocytaire (PML) est bien connu. Dans cette maladie, la fusion du gène PML (chromosome 15) avec le gène $RAR\alpha$ (chromosome 17) mène à une translocation chromosomale (tc/15 :17) (de Thé et al. 1991, Kakizuka et al. 1991, Zelent et al. 2001). Il en résulte des récepteurs mutants PML/ $RAR\alpha$ qui ont des affinités anormalement grandes pour les corépresseurs et ne répondent plus aux doses physiologiques du ligand AR pour détacher leurs corépresseurs et permettre la transcription des gènes-clés de la différenciation myéloïde (Melnick and Licht 1999). La conséquence est l'apparition des cellules promyélocytaires immatures, l'accumulation de granulocytes dans la moëlle osseuse et ultimement des hémorragies mortelles. L'acide rétinoïque en doses pharmacologiques peut corriger la situation, en permettant la différenciation myéloïde *in vivo* et provoquant des rémissions cliniques (Melnick and Licht 1999). Il existe une abondante littérature sur l'emploi complémentaire de rétinoïdes dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire (Chomienne et al. 1990, de

Botton et al. 2005, Lengfelder et al. 2005, Tallman et al. 2002). D'autres cancers sont associés à des perturbations du métabolisme des rétinoïdes. C'est le cas de certains cancers du sein, où des cellules cancéreuses de souche MCF-7 n'expriment pas les enzymes nécessaires pour produire de l'AR (Rexer et al. 2001). C'est le cas pour le cancer de la prostate, où le gène RALDH2 est dysfonctionnel, ce qui empêche la production d'AR (Kim H et al. 2005). Enfin les propriétés de promoteur de la différenciation cellulaire de l'AR le rendent intéressant pour plusieurs approches préventives anticancérigènes (Bertram and Vine 2005, Niles 2004).

1.5.4. Vitamine A et embryogenèse

La vitamine A est nécessaire pour la spermatogenèse, l'ovogenèse, l'organogenèse et la croissance. A partir des premiers stades de l'embryon, la majorité des axes de développement embryonnaire dépendent de la vitamine A sous forme d'AR via les récepteurs nucléaires RAR et RXR. Un taux optimal d'AR est essentiel pour le développement normal de différents organes et systèmes tels que les systèmes nerveux, respiratoire, cardiovasculaire, la vision et les reins (Bhat and Manolescu 2008, Clagett-Dame and DeLuca 2002, Niederreither et al. 1999, Niederreither et al. 2002a, Ross SA et al. 2000a). L'embryon dépend également de l'AR au niveau de la formation de sa symétrie bilatérale et du développement des extrémités, de l'oreille interne, du pharynx et du cœur (Maden M 2006, Niederreither et al. 2001, Niederreither et al. 2003, Romand 2003). Les développements rénal et uro-génital sont aussi conditionnés par l'AR (Goodyer et al. 2007, Makrakis et al. 2007). Un taux excédentaire d'AR dans l'embryon est aussi nocif qu'un déficit, et une régularisation optimale est essentielle. La consommation d'alcool par la mère durant la grossesse peut mener à une déficience d'AR chez l'embryon, due au fait que la synthèse de l'AR est diminuée suite à la compétition que l'éthanol fait au ROL à l'étape de l'oxydation par les ROL-déshydrogénases (RDH). Ceci mène à des déformations crâniennes et faciales spécifiques du fœtus, plus communément connues sous le nom de syndrome d'alcoolisme fœtal. Une large contribution à l'étude des rétinoïdes en général a été apportée par le Dr Pierre Chambon, France (Chambon P et al. 1996, 2004, 2005).

CHAPITRE 2 –La RBP4 dans l’obésité, la RI et le diabète de type 2 – chapitre publié

« *Chapter 2: Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance* »

Daniel-Constantin Manolescu a contribué de façon déterminante à la publication de cette revue de littérature en réalisant le schéma conceptuel, les recherches bibliographiques, la présentation et l’interprétation des données, le design des structures et des paragraphes, l’écriture du manuscrit, la mise en page, le management administratif et éditorial, la soumission pour publication et les réponses aux réviseurs. Par son esprit d’initiative, son efficacité et son autonomie, il a beaucoup enrichi le projet et a largement contribué à augmenter sa notoriété. Le directeur, Dr P.V. Bhat, a vérifié l’écriture, l’a enrichie et l’a validé scientifiquement. Le collectif éditorial CRC-Press a validé l’article par les pairs et l’a publié.

A la demande du directeur concepteur du projet, Dr. Pangala V Bhat, nous avons coécrit et publié cet article de revue sur la RBP4 dans l’obésité, la résistance à l’insuline et le diabète de type 2, spécialement destiné à être inclus dans la revue de littérature de notre thèse. L’original, tel que publié en Anglais dans le livre « *Vitamin- Binding Protein/Functional Consequences- Chapter 2 ; CRC Press 2013/2014 -ISBN : 9781439880166* », se trouve dans les annexes de notre thèse sous le titre : « *Chapter 2 : Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance* by Pangala V. Bhat and Daniel-Constantin Manolescu ». Sa version française est maintenant harmonieusement intégrée dans la revue de littérature de notre thèse, soit le présent Chapitre 2: « **La RBP4 dans l’obésité, la résistance à l’insuline et le diabète de type 2** », suite aux conseils de nos trois directeurs de recherches. Cette revue est publiée selon les normes éditoriales en cours pour les revues de littérature, donc avec des références probantes plus un bref développement et nos commentaires. Nous annexons l’accord officiel FESP-UdeM de Dr P.V. Bhat, notre coauteur, pour l’inclusion dans la thèse.

Ceci représente la première publication de notre thèse. La lettre de confirmation, signée par le directeur initial du projet Dr P.V. Bhat et mentionnant également ce chapitre, se trouve dans les Annexes. L’ouvrage « *Vitamin-Binding Protein/Functional Consequences* » - CRC/TFG 2014 est une contribution internationale de 8 pays (dont les États-Unies., le Japon, l’Angleterre, la France, l’Australie, la Suisse, la Corée du Sud) et nous représentons (avec grande fierté) le Canada. Un original est déposé au Vice-Rectorat, Université de Montréal.

2.1. Introduction

L'augmentation de la masse adipeuse, associée à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2 (T2DM) (Kahn et Flier 2000), s'accompagne d'une diminution de la capacité de l'insuline à réduire la production hépatique de glucose libérée dans le sang et à augmenter la captation du glucose sanguin par les tissus adipeux et musculaires (Saltiel et Khan 2001). L'excès d'énergie entreposé dans le tissu adipeux joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie énergétique globale de l'organisme. Il est bien établi que les tissus adipeux servent non seulement comme dépôts de réserves d'énergie, mais aussi à sécréter un certain nombre de facteurs de signalisation (des adipokines) dans la circulation, tels que la protéine C-réactive, la leptine, la résistine, l'adiponectine et le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), dont plusieurs sont reconnus pour leur action favorable ou défavorable sur la sensibilité à l'insuline (Rajala & Scherer 2003). Depuis 2005, la RBP4, une protéine hépatique dont la seule fonction connue auparavant était la livraison de ROL d'origine hépatique aux autres tissus a également été identifiée comme étant une adipokine contributive à la résistance à l'insuline (Yang et al. 2005). Ce chapitre 2 résume les données recueillies par plusieurs études chez la souris et chez l'humain sur les liens entre la RBP4, l'obésité et la résistance à l'insuline.

2.2. Obésité, résistance à l'insuline et diabète de type 2

L'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2 sont des perturbations métaboliques devenues des pandémies mondiales. Malgré les efforts de la recherche pour prévenir et guérir ces affections complexes, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement efficace. C'est pourquoi des nouvelles recherches pharmacologiques et nutritionnelles, doivent être explorées. L'excès de poids se manifeste par une accumulation de graisse et se définit par un indice de masse corporelle (IMC) au-delà de 25 kg/m² pour le surpoids et égale ou au-delà de 30 kg/m² pour l'obésité. Dans l'histoire de l'humanité, l'obésité est la première pandémie non infectieuse (James W. P. 2008a, c), affectant 700 millions d'adultes, de même que 50 millions d'enfants d'âge préscolaire, avec en plus 2,5 milliards d'adultes en surpoids, selon les données de 2015 de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et de l'*International Obesity Task Force* (IOTF). Le surpoids, l'obésité et leurs complications sont le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial (OMS 2013). L'obésité est associée à une augmentation globale de l'incidence du syndrome métabolique et fournit ainsi un immense réservoir

populationnel à risque pour le développement du diabète et de ses complications. L'obésité abdominale est davantage associée aux composantes du syndrome métabolique, à la résistance à l'insuline et au risque de diabète de type 2. Souffrir d'au moins trois critères de santé parmi les cinq suivants, indique la présence du syndrome métabolique : **1)** un surplus de poids corporel surtout abdominal (IMC au-delà de 25 kg/m² et tour de taille >102 cm/hommes et > 89 cm/femmes) ; **2)** une haute pression artérielle ($\geq 130/85$ mmHg) ; **3)** un taux de triglycérides sanguins $\geq 1,7$ mmol/L ; **4)** un taux de bon cholestérol HDL $\leq 1,03$ mmol/L /hommes et $\leq 1,29$ mmol/L/femmes). Souvent associées au syndrome métabolique nous retrouvons ,avec le temps, l'intolérance au glucose, une résistance à l'insuline indiquée par une glycémie à jeun $\geq 5,6$ mmol/L, la sécrétion d'insuline perturbée, les stéatoses hépatiques, la dyslipidémie, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (Kahn and Flier 2000). Lorsque l'augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas ne compense plus pour la résistance à l'insuline de l'organisme, l'hyperglycémie s'installe. Dans l'obésité associée à la résistance à l'insuline et à l'inflammation chronique, plusieurs voies métaboliques seront affectées, perturbant plusieurs cascades de signalisation dans les cellules (Pocai et al. 2005, Qatanani and Lazar 2007). Chez les sujets obèses, l'augmentation des acides gras plasmatiques peut également contribuer au développement de la résistance à l'insuline par l'activation de diverses protéines kinases (Petersen and Shulman 2006). Plusieurs perturbations de diverses adipokines (augmentation de la résistine, RBP4, TNF α , Interleukin-6 et diminution de l'adiponectine) contribuent également à la résistance à l'insuline (Kershaw and Flier 2004). L'accumulation des macrophages dans les tissus adipeux blancs dans l'obésité, augmente la production de cytokines inflammatoires, qui diminuent aussi la sensibilité à l'insuline (Weisberg et al. 2003). Parmi les changements associés à l'obésité les diminutions des influx nerveux, dans les réponses cérébrales à des signaux hormonaux et métaboliques, affaiblissent aussi la sensibilité à l'insuline (Pocai et al. 2005).

Le diabète de type 2 est une maladie chronique classée comme la quatrième cause mondiale de mortalité, et elle touchera approximativement 300 millions de personnes en 2025, selon les projections de l'OMS en 2012, représentant près de 90% de toutes les formes de diabète. L'étiologie du diabète de type 2 est multifactorielle, ayant des causes génétiques, environnementales et d'habitudes de vie, avec un risque augmenté dans l'obésité, le syndrome métabolique et la résistance à l'insuline (James W. P. 2008b, Klein et al. 2004). Le tableau

clinique, se manifestant parfois par des symptômes classiques de polyurie, polydipsie et polyphagie, est caractérisé par divers degrés d'hyperglycémie chronique (glycémie > 126mg/dl à jeun (7 mmol / L) et > 200mg/dl (10mmol / L) 2 h après l'ingestion orale de 75g glucose). La résistance à l'insuline est associée à des perturbations majeures dans les métabolismes des glucides, lipides et protéines et à une dysfonction de la cellule bêta du pancréas (OMS, 2009). À long terme des complications chroniques peuvent survenir si le diabète est mal contrôlé. Mentionnons la rétinopathie qui représente la deuxième cause de cécité (Fong et al. 2003), la néphropathie qui est la première cause d'insuffisance rénale terminale (Molitch et al. 2003, Molitch et al. 2004), la neuropathie qui est la première cause d'amputation non traumatique (Mayfield et al.2003) et une cause majeure (75% de plus selon ADA, 2012) de maladies cardiovasculaires (Kannel et al. 1990). Dans la physiopathologie du diabète de type 2, on note la résistance à l'insuline souvent associée à l'obésité avec hyperinsulinémie au stade prédiabétique. La sécrétion compensatoire augmentée d'insuline mène progressivement à l'épuisement des cellules β du pancréas. Lorsque les cellules β ne peuvent plus compenser pour la résistance à l'insuline, il s'en suit une hyperglycémie et l'installation du diabète avec ses symptômes et ses risques métaboliques (Saltiel 2000).

2.3. Aspects métaboliques de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2

Le foie, les muscles squelettiques et les tissus adipeux sont des cibles majeures de l'action métabolique de l'insuline. L'insuline régule l'homéostasie du glucose en diminuant la production hépatique de glucose dans le sang et en augmentant la captation du glucose circulant, par les muscles et les tissus adipeux. Dans des conditions physiologiques les muscles squelettiques, de par leur masse, sont des sites prédominants d'absorption de glucose, moins de glucose étant absorbé par les tissus adipeux.

Dans l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2, tous les organes du corps sont affectés par différentes perturbations pathologiques, mais certains tissus le sont précocement. C'est notamment le cas du pancréas, des tissus adipeux, des muscles et du foie puisqu'ils sont davantage impliqués dans le métabolisme de l'insuline, du glucose et du métabolisme énergétique en général (Stumvoll et al. 2005). Les tissus adipeux représentent des tissus clés dans l'installation du syndrome métabolique, étant donné leur implication dans l'obésité et le métabolisme énergétique (Rosen and MacDougald 2006). Le tissu adipeux n'est

pas seulement un dépôt de substrat énergétique, il est également un tissu endocrine qui sécrète diverses adipokines avec fonctionnalités paracrines ou endocrines (Duncan et al. 2007, Frayn et al. 2006, Kahn and Flier 2000). Ces cytokines et hormones secrétées par le tissu adipeux ont un grand impact sur la sensibilité à l'insuline dans l'organisme et l'évolution de l'obésité vers le syndrome métabolique, le prédiabète et éventuellement le diabète de type 2 (Catalán et al. 2009b, Tönjes et al. 2010). Il existe des différences métaboliques selon la topographie des tissus adipeux (sous-cutané versus viscéral) (Gesta et al. 2006, Peinado et al. 2010) et encore plus entre les types des tissus adipeux comme par exemple blanc (WAT) versus brun (BAT) (Enerbäck 2009, 2010a, b). Le tissu adipeux blanc est la principale réserve d'énergie, où les acides gras de la diète sont estérifiés et entreposés sous forme de triglycérides. Les muscles influencent grandement l'homéostasie énergétique de l'organisme, de par leur métabolisme énergétique intense qui entraîne l'absorption et l'oxydation des sucres et des acides gras de la circulation. Le foie est également affecté par le diabète qui perturbe l'équilibre entre l'accumulation, la synthèse et la sécrétion de glucose dans le sang. Il est maintenant établi que même l'appareil digestif et la flore intestinale jouent un rôle dans le développement de l'obésité et du diabète (Burcelin et al. 2009, Serino et al. 2013, Serino et al. 2009).

Ces pathologies, influencent grandement les tissus de l'organisme où plusieurs voies métaboliques et cascades géniques sont affectées de manière spécifique. La sensibilité à l'insuline et le métabolisme énergétique sont principalement affectés (Bouzakri et al. 2004, Morino et al. 2008, Morino et al. 2006), mais la littérature démontre également de plus en plus de perturbations dans le métabolisme de la vitamine A (Frey and Vogel 2011). Comprendre les éléments qui mènent à l'état prédiabétique, est important autant pour la prévention que pour le traitement du diabète de type 2. Parmi ces éléments, on retrouve chez le patient obèse et dans les modèles animaux d'obésité, un apport excédentaire d'énergie, une baisse de l'activité physique, la diminution de la sensibilité à l'insuline, et un métabolisme des acides gras perturbé (Blaak et al. 2000a, Blaak et al. 2000b). Nous rappelons que le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline, du syndrome métabolique et du diabète de type 2 est multifactoriel, incluant des cofacteurs génétiques et de mauvaises habitudes de vie (Bastard et al. 2000a, Bastard et al. 2000b, Rieusset et al. 2004). Parmi les éléments pouvant coexister dans ces pathologies, on peut énumérer : **1)** Un métabolisme énergétique perturbé qui diminue la sensibilité à l'insuline (Bouzakri et al. 2004, Morino et al. 2008, Morino et al. 2006);

2) L'obésité et le gras ectopique qui contribuent également à la résistance à l'insuline. Un excès d'acides gras libres (AGL) conduit à la lipotoxicité qui va freiner la sécrétion de l'insuline ainsi que son action. Cet effet peut conduire au développement de prédiabète et éventuellement du diabète avec hyperglycémie. La combinaison de l'hyperlipidémie et de l'hyperglycémie conduit à la gluco-lipotoxicité (Prentki 1996, Prentki et al. 2002, Prentki and Nolan 2006); 3) Des altérations dans la **morphologie des mitochondries** (Galloway et al. 2012a, Galloway et al. 2012b, Galloway and Yoon 2012a, b), dans leur **fonctionnement** (James A. M. et al. 2012, Kelley et al. 2002, Petersen and Shulman 2006, Morino et al. 2005, Ritov et al. 2005, Lowell and Shulman 2005) et dans leur **biogenèse** (Mootha et al. 2003, Patti et al. 2003, Debarb et al. 2004) ; 4) Un stress oxydatif (ROS/H₂O₂) augmenté (Bonnard et al. 2008, Bravard et al. 2011) ; 5) Plusieurs adipokines reliées à la résistance à l'insuline, dont la RBP4, augmentées (ex. protéine C réactive, résistine, PAI1-« *plasminogen activated factor 1* », TNF α - « *tumor necrosis factor α* », IL6- « *interleukin 6* ») (Rajala and Scherer 2003).

Parmi les principales perturbations moléculaires dans la résistance à l'insuline nous retrouvons une phosphorylation anormale (sur serine) du substrat de l'insuline IRS1, ce qui bloque la phosphorylation normale (sur une tyrosine) du IRS1 en présence de l'insuline, bloquant ensuite tout l'axe de signalisation IRS1-PI3K-PKB/AKT-GLUT4, donc la fonctionnalité et la translocation membranaire de la protéine GLUT4. Ceci entraîne une diminution de l'entrée du glucose sanguin dans la cellule (Bouzakri et al. 2004, Qatanani and Lazar 2007, Morino et al. 2008). La phosphorylation est la fixation d'un groupe phosphate (PO₄³⁻) sur une molécule protéique. Cette réaction chimique est catalysée par des enzymes kinases, qui fixent un ou plusieurs groupes phosphates sur des acides aminés ciblés, tels la tyrosine et/ou la sérine pour l'IRS1. La phosphorylation est un processus temporaire pour moduler l'activité de certaines protéines. Le processus contraire est la déphosphorylation par des phosphatases (Jaspard E. 2004). L'absorption de glucose, stimulée par l'insuline, dans les cellules musculaires et les adipocytes dépend en grande partie de la translocation, régulée par l'insuline, du transporteur de glucose GLUT4 de compartiments intracellulaires à la membrane cellulaire (Shepherd and Khan, 1999). L'expression de GLUT4 est diminuée dans les adipocytes mais pas toujours dans les muscles squelettiques des animaux et des humains atteints d'obésité et de résistance à l'insuline (DeFronzo 1997, Shepherd and Khan 1999, Abel et al. 2001). Étant donné que les muscles squelettiques sont des sites prédominants d'absorption de glucose, l'expression

(mRNA) non altérée du gène GLUT4 dans les muscles est surprenant. L'équipe d'Abel et al. (2001) a alors suggéré une dysfonction de la protéine GLUT4 et proposé la possibilité qu'un nouveau facteur sécrété dans la circulation à partir des tissus adipeux, dont l'expression de GLUT4 est diminuée, puisse contribuer, entre autres, à perturber l'installation et la fonctionnalité de la protéine GLUT4 au niveau membranaire des myocytes, diminuant ainsi leur sensibilité à l'insuline. Un tel facteur semble être la RBP4, une protéine hépatique connue en tant que transporteur du ROL dans le sang, qui depuis 2005 fut également caractérisée en tant qu'adipokine qui contribue à la résistance à l'insuline, les mécanismes n'étant pas complètement élucidés (Yang et al. 2005, Graham et al 2006, Tamori et al. 2006).

2.4 Association entre RBP4, obésité et résistance à l'insuline

Après expérimentations sur des rongeurs, certaines études chez l'humain ont également observé des associations fortes entre les concentrations élevées de RBP4 dans le sérum, l'obésité et la résistance à l'insuline (Aeberli et al. 2007, Gavi et al. 2007). Toutefois, d'autres études n'ont pas pu confirmer cette corrélation directe entre la résistance à l'insuline et la RBP4 sérique augmenté (Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007). Cette contradiction pourrait être attribuée à des méthodologies d'évaluation différentes (Graham T. E. et al. 2007). Plus de recherches sont nécessaires autant sur la souris que chez l'humain.

2.4.1 Études expérimentales sur la RBP4 et la résistance à l'insuline

Nous avons vu que le tissu adipeux exprime et sécrète dans la circulation plusieurs adipokines parmi lesquelles la RBP4. Cette adipokine a la même structure que le transporteur hépatique de rétinol RBP4, sans toutefois sortir du ROL (apo-RBP4) du tissu adipeux. Plusieurs études ont observé une corrélation significative entre les concentrations sériques élevées de RBP4 et l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. De plus elles ont démontré que les souris RBP4/KO conservent une meilleure sensibilité à l'insuline, même en conditions d'obésité et de diète riche en gras (D'Ambrosio et al. 2011, Tönjes et al. 2010, Yang et al. 2005). La participation de la RBP4 à la résistance à l'insuline a été documentée par Yang et al en 2005, par une analyse globale de l'expression des gènes des tissus adipeux hébergeant une inhibition génétique primaire et exclusive de l'expression du GLUT4 (Fat-GLUT4/KO). Ces chercheurs ont observé que les taux d'expression de la RBP4 ont été augmentés de 2,3 fois chez les souris

avec une ablation spécifique du GLUT4 adipocytaire, alors qu'ils ont diminué de 54% chez des souris surexprimant la GLUT4 adipocytaire, ce qui a permis d'établir une relation inverse entre les expressions du GLUT4 et de la RBP4. Ainsi des souris transgéniques démunies du transporteur cellulaire de glucose GLUT4 dans leurs tissus adipeux seulement (Fat-GLUT4/KO) ont développé de la résistance à l'insuline, une concentration sérique de RBP4 augmentée et une expression (mRNA) augmentée de l'adipokine RBP4. Toutefois, ils n'ont pas présenté une expression hépatique (mRNA) augmentée de RBP4 (Yang et al. 2005). Les mêmes chercheurs ont démontré que les niveaux circulants de RBP4 sont augmentés non seulement dans plusieurs modèles murins d'obésité et de résistance à l'insuline (génétiquement obèses ou par alimentation à forte teneur en matières grasses, HFD « *high fat diet* »), mais aussi chez les humains avec ces conditions cliniques. De plus, ils ont démontré que lorsqu'elles sont traitées avec un agoniste du PPAR- γ (rosiglitazone), les souris Fat-GLUT4/KO ont présenté une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose, ainsi qu'une baisse de la concentration de la RBP4 sérique. Lorsque les niveaux de la RBP4 circulante ont été augmentés artificiellement chez la souris (par surexpression génique ou en injectant de la RBP4), on a induit une résistance à l'insuline, alors que le knock-out du gène codant pour la RBP4, a augmenté la sensibilité à l'insuline. Il a donc été suggéré que la RBP4 contribuait à la résistance à l'insuline (D'Ambrosio et al. 2011, Graham T. E. et al. 2006c, Tamori et al. 2006, Yang et al. 2005). A l'aide de souris obèses et GLUT4-KO seulement dans leurs adipocytes, Yang et al. ont démontré en 2005 et Tamori et al. ont confirmé en 2006, que le mécanisme passerait par la sécrétion adipocytaire de RBP4, stimulée par l'expression adipocytaire diminuée de GLUT4 en condition d'obésité sévère. Cette adipokine RBP4 contribuerait ensuite à diminuer la fonctionnalité des GLUT4 et à augmenter la RI au niveau membranaire des myocytes, diminuant la sensibilité des muscles à l'insuline. Il s'ensuit une diminution d'absorption du glucose sanguin par les muscles.

Chez des rats hypertendus, une concentration sanguine élevée de la RBP4 et l'augmentation des taux d'expression de la RBP4 dans le foie et le tissu adipeux ont été associées à la résistance à l'insuline (Ou et al. 2011). Le traitement de ces rats avec du fenrétinide pour augmenter l'excrétion urinaire de RBP4 a considérablement diminué les taux circulants de RBP4, diminution accompagnée d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Chez les souris nourries par la HFD, la suppression d'expression de la RBP4 dans les tissus adipeux et le foie, par des oligonucléotides anti-RBP4, a entraîné une diminution de la RBP4 sanguine, et une

meilleure sensibilité à l'insuline (Tan et al. 2011). Bien que le mécanisme soit incertain, il semblerait qu'une concentration sérique élevée de RBP4, stimule aussi une enzyme spécifique dans le foie (la « *phosphoenolpyruvate carboxykinase* » - PEPCK) ce qui stimule la sécrétion hépatique de glucose dans le sang (Yang et al. 2005). Parallèlement, l'augmentation de la RBP4 sérique diminuerait la sensibilité à l'insuline dans les muscles, possiblement par l'inhibition de la phosphorylation normale (sur tyrosine) du récepteur membranaire à l'insuline (IR) et son substrat IRS1 (Frey and Vogel 2011, Tamori et al. 2006). L'effet conjugué de ces deux phénomènes, contribuerait à l'hyperglycémie sanguine pré-diabétique et ensuite au diabète lorsque la sécrétion pancréatique d'insuline n'arrive plus à compenser pour la résistance à l'insuline. Chez des rats obèses, l'administration de fénofibrate, un activateur de PPAR α , a considérablement diminué les taux d'ARNm adipocytaires de RBP4, mais pas dans le foie. Une corrélation avec des taux réduits de la RBP4 circulante et une amélioration de la sensibilité à l'insuline a été établie (Wu et al. 2009). Dans nos propres travaux avec un traitement spécifique à l'AR, des taux de RBP4 circulante très élevés ont été abaissés chez des souris sévèrement obèses, RI et diabétiques (ob/ob), ce qui a entraîné une augmentation de leur sensibilité à l'insuline (Manolescu et al. 2010). Il est probable qu'en plus d'abaisser la RBP4 du sérum, l'AR pourrait exercer ses effets sur l'homéostasie du glucose et de la vitamine A en modulant l'expression des divers gènes associés et dépendants des récepteurs de l'AR, comme par exemple des gènes du métabolisme du ROL ou encore certains gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Les résultats expérimentaux chez les animaux suggèrent que la RBP4 contribue à la résistance à l'insuline induite par l'obésité et qu'elle pourrait être une cible pour le traitement du T2DM.

2.4.2 Études cliniques : relations RBP4, résistance à l'insuline et diabète de type 2

Chez les sujets obèses non diabétiques et diabétiques, les taux sériques de RBP4 sont augmentés et positivement corrélés avec l'indice de masse corporelle (IMC) (Graham et al. 2006, Yang et al. 2005). Certaines variantes du gène de la RBP4, tel que celles engendrées par l'accumulation de plusieurs polymorphismes mono-nucléotidiques (SNPs), ont été associées à des expressions augmentées (mRNA) du gène de la RBP4 dans le tissu adipeux viscéral, à des taux sériques augmentés d'acides gras libres, à l'obésité et à l'accumulation de masse adipeuse viscérale, ou encore au diabète de type 2 (Kovacs et al. 2007, Munkhtulga et al. 2010). D'autres

auteurs ont également signalé une association entre les taux augmentés de la RBP4 circulante et l'augmentation de la masse adipeuse viscérale (Cho et al.2006, Gavi et al.2007, Jia et al. 2007, Lee et al.2007, Kelly et al. 2010). De plus, des niveaux circulants élevés de RBP4 sont associés à des marqueurs d'inflammation systémique, et à une circonférence de la taille et un rapport taille-hanche élevés (Hermsdorff et al.2010).

La diminution du poids, obtenue par exercice physique et/ou chirurgie bariatrique, entraîne une réduction des taux de RBP4 circulante et adipocytaire (Graham et al. 2006, Janke et al. 2006, Haider et al. 2007, Vitkova et al.2007, Lee et al.2008). La diminution du poids corporel s'accompagne d'une diminution des taux sanguins de RBP4 et d'une meilleure sensibilité à l'insuline même chez des sujets non diabétiques (Lee et al.2008). Ces auteurs ont également observé une corrélation directe entre la diminution des taux sériques de RBP4 et ceux du tissu adipeux viscéral abdominal. Chez les sujets obèses, la concentration de la RBP4 sérique est associée négativement à la sécrétion d'insuline (Broch et al.2007). La diminution du taux de la RBP4 circulante corrélait positivement avec la réduction des taux de triglycérides et négativement avec l'augmentation du cholestérol HDL chez des femmes obèses, après la perte de poids due à la chirurgie bariatrique (Broch et al.2010). Le niveau de la RBP4 circulante est corrélé positivement avec l'intensité de la stéatose hépatique plutôt qu'avec la masse adipeuse totale chez les sujets non diabétiques (Stefan et al.2007). Le profil protéinique et métabolomique du sérum a révélé une association directe de la concentration sanguine de RBP4 avec des marqueurs de l'obésité (Oberbach et al.2011). Dans une autre étude, la diminution du poids par exercice physique chez des femmes obèses a entraîné une réduction du taux de la RBP4 circulante, plus fortement associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline que d'autres adipokines (Graham et al.2006). Chez des sujets obèses et à jeun, la concentration de la RBP4 circulante corrélait positivement avec le rétinol dans le sang (Mills et al.2008). Ces chercheurs ont également signalé une baisse du ration ROL/RBP4 chez les sujets obèses en raison de l'apo-RBP4 élevée (Mills et al.2008). Il existe donc une forte corrélation entre l'obésité et l'augmentation des taux sanguins et adipocytaires de RBP4.

Les taux sanguins de RBP4 sont positivement corrélés avec l'intensité de la résistance à l'insuline chez les sujets atteints d'obésité, d'intolérance au glucose ou de T2DM et/ou chez des sujets non-diabétiques mais ayant une forte histoire familiale de T2DM (Yang et al.2005, Cho et al.2006, Graham et al.2006, Chavez et al.2009, Kloting et al.2010). L'examen des niveaux

d'expression des adipokines sériques dans les tissus adipeux des patients atteints de résistance à l'insuline et/ou de T2DM, a démontré une augmentation de l'expression de RBP4 dans les adipocytes sous-cutanées, suggérant que l'élévation du taux de la RBP4 circulante dans ces pathologies résulte, du moins en partie, d'une synthèse et d'une sécrétion accrues de RBP4 à partir de tissus adipeux sous-cutanés (Samaras et al.2010).

L'augmentation des taux sanguins de RBP4 est associée à la résistance à l'insuline chez les femmes post-ménopausées et chez les personnes âgées (An et al.2009, Suh et al. 2010). Ainsi les concentrations sanguines élevées de la RBP4 sont associées à l'évolution de plusieurs composants du syndrome métabolique, tels que l'augmentation de l'IMC, le ratio taille-hanche, les triglycérides sériques et la pression artérielle systolique. Les interventions qui ont diminué la résistance à l'insuline chez l'homme, dont l'activité physique, ont réduit également la concentration sanguine de la RBP4 (Haider et al. 2007, Lim et al. 2008, Ku et al. 2010). Il est à remarquer, néanmoins, que l'exercice physique s'accompagne d'une réduction des taux sanguins de la RBP4 uniquement chez les sujets pour lesquels la sensibilité à l'insuline s'est améliorée. Le traitement à la rosiglitazone, qui augmente la sensibilité à l'action de l'insuline, réduit le taux de RBP4 circulante chez les patients atteints de T2DM (Jia et al. 2007). Plusieurs variantes du gène de la RBP4 sont également associées à une incidence accrue du T2DM (Craig et al.2007, Kovacs et al.2007, Hu et al.2008, van Hoek et al.2008). Ces observations suggèrent que les taux sériques de RBP4 sont déjà élevés dans les premiers stades de la résistance à l'insuline et pourraient être un prédicteur du développement du T2DM, ce qui permettrait des interventions précoces. Il appert que des facteurs qui diminuent la résistance à l'insuline tels que l'exercice, la perte de poids et les sensibilisateurs à l'insuline, diminuent également les taux sanguins de la RBP4. Ces taux de RBP4 pourraient donc servir d'indice complémentaire pour évaluer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Certains auteurs ont même postulé que les taux élevés de la RBP4 circulante pourraient également être un biomarqueur utile dans l'athérosclérose et le développement de maladies cardiovasculaires (Cabre et al.2007, Ingelsson et al.2009, Stuck and Kahn 2009, Sasaki et al.2010, Pala et al.2012). Il est à remarquer qu'un taux de RBP4 épicaudique élevé et des taux diminués de GLUT4 dans les tissus adipeux épicaudiques et sous-cutanés sont associés à la maladie coronarienne (Salgado-Somoza et al.2012). L'augmentation des taux de la RBP4 circulante est observée chez les patients atteints de cardiomyopathie inflammatoire dilatée (congestive) en contexte de T2DM (Bobbert et al.2009). Bien que toutes

ces études révèlent une association entre la RBP4 sérique et la maladie coronarienne, il n'est pas clair si l'augmentation de RBP4 observée chez ces patients est la cause ou plutôt la conséquence d'une telle maladie.

2.4.3 RBP4 dans le diabète sucré gestationnel

Plusieurs auteurs ont signalé l'augmentation des taux de la RBP4 sérique chez les femmes enceintes atteintes de diabète sucré gestationnel (GDM) « *gestational diabetes mellitus* » (Klein et al.2010, Su et al.2010, Ortega-Senovilla et al.2011, Saucedo et al.2011). Ces études suggèrent que les taux sériques de RBP4 pourraient être considérés comme un marqueur pertinent de la résistance à l'insuline et du métabolisme lipidique altéré pendant la grossesse. Une corrélation positive a été trouvée entre les concentrations de RBP4 dans le sang du cordon ombilical et le poids du bébé à la naissance, ce qui suggère que la RBP4 est impliquée dans la croissance du fœtus (Chan et al.2011). Dans une autre étude, les taux sériques de la RBP4 et son expression dans les tissus adipeux sous-cutanés se sont révélés élevés chez les femmes enceintes atteintes de GDM, ce qui suggère que l'expression de RBP4 trop élevée dans les tissus adipeux peut contribuer à l'augmentation de la RBP4 sérique dans ces conditions (Kuzmicki et al.2011). Une étude, qui n'a pas trouvé des taux sériques de RBP4 élevés chez des femmes atteintes de GDM, a néanmoins trouvé que ces mêmes taux de RBP4 avaient beaucoup augmenté tout de suite après l'accouchement (Krzyzanowska et al.2008). Ils avaient également trouvé que le ratio molaire RBP4: ROL circulants durant la grossesse était plus élevé et corrélé avec les glycémies à jeun chez ces patientes. Ils ont donc suggéré qu'en plus des valeurs individuelles du ROL et de la RBP4, des ratios molaires RBP4: ROL (ou ROL: RBP4) pourrait être un marqueur révélateur, pour l'évaluation de la résistance à l'insuline gestationnelle.

2.4.4 RBP4, obésité et résistance à l'insuline chez les enfants et adolescents

Le lien entre la RBP4, l'obésité et le syndrome métabolique a également été exploré chez les enfants et les adolescents de multiples milieux ethniques. Les niveaux de RBP4 circulante ont été élevés dans les deux groupes, en contexte de ces pathologies (Aeberli et al. 2007, Balagopal et al.2007, Reinehr et al.2008, Friebe et al.2011, Yeste et al.2010, Kim et al. 2011). Chez les enfants pré-pubertaires et pubertaires précoces, le taux circulant de RBP4 et le ratio RBP4/ROL (ou ROL/RBP4) étaient positivement corrélés avec l'obésité et les principaux composants du syndrome métabolique, dont la résistance à l'insuline (Lee et al. 2007). Dans

cette même étude, d'autres paramètres, tels que l'apport alimentaire en vitamine A et l'inflammation sub-clinique, ont également été évalués, et une corrélation positive a été démontrée entre les taux sanguins de la RBP4 et ceux de la protéine C réactive de haute sensibilité, un indice inflammatoire reconnu. De plus, une association directe entre les niveaux sanguins de RBP4, la résistance à l'insuline et les triglycérides a été observée, même chez des adolescents non-obèses, et entre la RBP4 et les triglycérides chez des adolescents obèses (Lee et al.2007). Les taux circulants de RBP4 sont élevés chez les enfants obèses souffrant d'intolérance au glucose et sont positivement corrélés avec le taux sanguin d'insuline, ce qui suggère que la RBP4 peut contribuer au développement de la résistance à l'insuline (Yeste et al.2010). Une autre étude a démontré que les taux sériques de RBP4 étaient corrélés positivement avec la masse adipeuse et la résistance à l'insuline chez les enfants obèses, mais pas avec la résistance à l'insuline pendant la puberté (Santoro et al.2009). Dans une cohorte rétrospective, l'augmentation des taux sanguins de la RBP4 était associée à une plus grande probabilité d'aggravation de la résistance à l'insuline chez les adolescents noirs en surpoids (Goodman et al.2009). Cette étude a également suggéré l'utilité de la RBP4 circulante en tant que biomarqueur de risque. Chez les enfants obèses, cette RBP4 a été principalement associée à l'augmentation de la masse adipeuse et, secondairement, à des paramètres du syndrome métaboliques et cardiovasculaires (Friebe et al.2011). Au début et à la mi-adolescence, les concentrations sanguines de RBP4 sont directement associées à de multiples facteurs de risque pour des comorbidités liées à l'obésité (Conroy et al.2011). Cependant, une autre étude a trouvé que les niveaux circulants de RBP4 étaient indépendamment associés à l'obésité et au développement pubertaire, mais pas à la résistance à l'insuline (Rhie et al.2011). Dans une étude de cohorte prospective, les enfants en surpoids avaient des concentrations sanguines de RBP4 significativement plus élevées que les enfants de poids normal (Choi et al. 2011). Des interventions sur le mode de vie (comme le sport) ont diminué les taux sériques de RBP4, en corrélation positive avec la diminution des marqueurs inflammatoires (Balagopal et al.2007). Dans une étude longitudinale sur des enfants obèses, la perte de poids a diminué les taux circulants de RBP4, le ratio RBP4/ROL et la résistance à l'insuline, suggérant un lien entre la RBP4, l'obésité et la résistance à l'insuline chez les enfants (Reinehr et al.2008).

2.4.5 La RBP4 dans la néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est une complication micro-vasculaire qui se manifeste d'abord par l'apparition d'une micro-albuminurie et progressivement par une macro-albuminurie et une baisse de la filtration glomérulaire (Tomaszewski et al. 2007, Nakamura et al. 2017, Doshi and Friedman 2017). Certains chercheurs ont trouvé que parmi les complications liées au diabète, seule la néphropathie est fortement associée à des altérations du taux de la RBP4 circulante (Akbay et al. 2010). Plusieurs études ont observé une augmentation de la RBP4 circulante chez les patients souffrant de diabète de type 2 ayant une micro-albuminurie et une baisse de la fonction rénale. Ainsi, les équipes de Scarpioni et Bernard, qui ont démontré des taux sanguins élevés de RBP4 si la fonction rénale est altérée, situation expliquée par un catabolisme et une filtration glomérulaire réduites de la RBP4 dans les reins malades (Scarpioni et al. 1976, Bernard et al. 1988). De plus, le catabolisme rénal altéré de la RBP4 entraîne l'accumulation d'une variante tronquée de RBP4 dans le plasma de patients atteints d'insuffisance rénale chronique (Jaconi et al. 1996). Chez les patients diabétiques de type 2 souffrant de micro-albuminurie, les taux circulants de RBP4 se sont révélés très élevés (Raila et al. 2007). La dysfonction rénale, telle que mesurée par les taux sériques d'acide urique, la sévérité de l'albuminurie et le taux de filtration glomérulaire chez les patients diabétiques, a été associée à une concentration de RBP4 circulante élevée (Chang et al. 2008, Henze et al. 2008). Masaki et collaborateurs ont démontré que les taux accrus de RBP4 circulante chez des patients diabétiques corrélaient positivement avec les taux de créatinine et négativement avec la clairance de la créatinine (Masaki et al. 2008). Même dans l'intolérance au glucose, une augmentation de la RBP4 dans le sang a été observée dans une population chinoise pré-diabétique avec micro-albuminurie mais n'ayant pas encore une baisse de la fonction rénale (Xu et al. 2009). Toutefois, la présence de rétinopathie ou de maladie cardiovasculaire chez des sujets diabétiques n'était pas associée à une augmentation de la concentration de RBP4 circulante (Akbay et al. 2010). Il a également été observé chez des sujets non-diabétiques qu'une néphrectomie unilatérale était associée à une augmentation du rétinol et de la RBP4 circulants (Henze et al. 2011) et que les donneurs de rein sont plus à risque de développer de la résistance à l'insuline (Shehab-Elden et al. 2009). Cependant, il n'est pas clair si l'élévation de la RBP4 sérique observée après une néphrectomie contribue à l'apparition d'une résistance à l'insuline.

chez les donneurs rénaux. Il est donc suggéré que l'augmentation de la RBP4 circulante associée à la baisse de la fonction rénale dans le diabète serait due, du moins en partie, à la baisse de la filtration de la protéine de transport par le rein.

2.5. Études sans corrélation entre la RBP4, l'obésité et la résistance à l'insuline

Il existe aussi quelques études effectuées chez l'humain qui n'ont pas trouvé des taux circulants de RBP4 élevés dans l'obésité ou dans le T2DM. L'équipe de Janke et collaborateurs n'a pas trouvé de corrélation directe entre la concentration sérique de RBP4 et la résistance à l'insuline et n'a détecté aucune différence dans les taux sanguins de RBP4 entre les femmes non diabétiques maigres et celles en surpoids ou encore obèses, après la ménopause (Janke et al. 2006). De plus, ces chercheurs n'ont trouvé aucune corrélation entre l'expression adipocytaire du gène de la RBP4 et les concentrations sanguines de RBP4. Chez certains sujets masculins atteints de T2DM ou d'une maladie coronarienne, les taux circulants de RBP4 n'étaient pas directement corrélés avec la résistance à l'insuline (von Eynatten et al. 2007). Dans une autre étude, les taux circulants de RBP4 n'étaient pas différents entre des humains sains et ceux qui étaient résistants à l'insuline et n'ont pas été corrélés avec la sensibilité à l'insuline non plus (Promintzer et al. 2007). Il y a même une étude qui, contrairement à l'augmentation traditionnelle du taux de la RBP4 circulante chez les patients atteints de T2DM, a mis en évidence une baisse de la concentration sanguine de RBP4 (Erikstrup et al. 2008). Néanmoins ces chercheurs ont observé des ratios de RBP4/ROL plus élevés chez les individus atteints de T2DM, et ils ont suggéré que des taux plus élevés de RBP4, par rapport au ROL, exprimés en RBP4/ROL ou ROL/RBP4, sont peut-être plus suggestifs que la RBP4 seule. Une restriction calorique chez des femmes obèses, non diabétiques, et pré-ménopausées a entraîné une réduction de l'expression de RBP4 adipocytaire et des taux circulants de RBP4. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre ces variations de RBP4 induites par le régime alimentaire et la sensibilité à l'insuline (Vitkova et al. 2007). Dans une autre étude clinique, malgré une large gamme d'IMC et de résistance à l'insuline, aucune relation significative n'a été observée entre l'expression du gène de la RBP4 dans le tissu adipeux ou la concentration de RBP4 dans le sang et la résistance à l'insuline (Yao-Borengasser et al. 2007).

Les taux de RBP4 sont réduits dans le sang des patients atteints de cirrhose du foie et ne sont pas liés à la résistance à l'insuline chez ces patients (Yagmur et al. 2007). Dans une autre

étude, aucune corrélation n'est ressortie entre les taux circulants de RBP4 et la résistance à l'insuline chez des femmes à risque de maladie vasculaire, soient-ils élevés ou faibles (Silha et al. 2007). Broch et collaborateurs n'ont pas signalé de différences de concentrations de la RBP4 circulante entre des sujets maigres, en surpoids ou obèses, ni aucune association avec l'âge, l'IMC, le rapport taille-hanche ou la sensibilité à l'insuline. Cependant, ils ont trouvé une association négative de la RBP4 circulante avec la sécrétion d'insuline chez des sujets obèses (Broch et al. 2007). Une autre étude, sur des Mexicains américains, n'a pas clairement démontré des liens entre la RBP4, l'obésité, la résistance à l'insuline globale ou la sécrétion d'insuline. Néanmoins, l'élévation de la RBP4 circulante et son association avec une tolérance au glucose diminuée ont été observées (Chavez et al. 2009). Les données d'une étude sur une population composée de jumeaux âgés ont indiqué que les taux élevés de RBP4 circulante dans le T2DM représentent un phénomène secondaire et non génétique, ayant probablement seulement un rôle mineur dans le développement de la résistance à l'insuline (Ribel-Midsen et al. 2009). Parlant des enfants et des adolescents obèses, il existe une étude qui n'a pas trouvé de taux sanguins de RBP4 différents entre les pré-pubères et les pubères, bien que les derniers soient sensiblement plus résistants à l'insuline, ce qui suggère un manque d'association causale entre la RBP4 et la résistance à l'insuline dans ces groupes populationnels (Santoro et al. 2009). Une autre équipe a révélé des taux de RBP4 plus élevés dans le sang des hommes obèses (IMC moyen 41,6 kg / m²) que chez les femmes obèses. Cependant, aucune association de cette RBP4 avec la résistance à l'insuline ou des composants du syndrome métabolique n'a été observée (Ulgen et al. 2010).

Plusieurs explications ont été proposées pour le manque de corrélations positives observé entre les niveaux circulants de RBP4, l'obésité et la résistance à l'insuline dans les études cliniques ci-dessus. Dans la plupart des enquêtes chez l'homme, la fonction rénale n'a pas été prise en compte. Étant donné que le T2DM est souvent associé à un dysfonctionnement rénal, ce qui conduit à une élévation de la RBP4 dans le sang, il est possible que l'augmentation de la RBP4 circulante observée dans certaines études soit tributaire d'une fonction rénale altérée plutôt que d'une résistance à l'insuline en elle-même (Chang et al. 2008, Henze et al. 2008, Masaki et al. 2008). Les différences dans les populations étudiées, pour l'âge, le sexe, l'origine ethnique, la taille de l'échantillon, le degré de résistance à l'insuline, le degré d'obésité (mesuré par l'IMC) et les autres paramètres du syndrome métabolique, peuvent contribuer à des résultats

divergents. L'âge et le sexe se sont révélés des déterminants indépendants de la RBP4 circulante (Cho et al. 2006, Gavi et al. 2007). Le statut de la vitamine A circulante des patients, qui peut être influencé par les concentrations sériques de RBP4, n'a pas été abordé (Promintzer et al. 2007). Puisque le ROL est principalement transporté par la RBP4, ses niveaux circulants peuvent être affectés par la résistance à l'insuline. Il est également possible que chez les patients diabétiques recevant des médicaments hypoglycémisants ou de l'insuline, ces traitements puissent affecter les taux circulants de RBP4 (von Eynatten et al. 2007, Chavez et al. 2009, Ribel-Madsen et al. 2009).

Des lacunes méthodologiques dans la quantification des niveaux circulants de RBP4 ainsi que la manipulation et le stockage des échantillons de sang ont également été évoquées. La plupart des études ont adopté un dosage immunoabsorbant enzymatique compétitif (ELISA) pour la RBP4 sérique. Les anticoagulants ajoutés lors de la collecte des échantillons de sang peuvent avoir altéré l'immuno-réactivité de la RBP4. Également, les taux élevés de lipides présents dans les échantillons de sang des patients obèses et diabétiques peuvent interférer avec l'ELISA. De plus, la conception expérimentale et les différents types d'anticorps utilisés dans les essais immunologiques peuvent avoir une incidence sur les taux sériques de RBP4. C'est pourquoi l'immuno-détection par immuno-buvardage western (*Western Blot*) standard est proposée comme fiable pour quantifier la RBP4 dans le sang, car elle fournit des quantités plus élevées et constantes de RBP4 circulante (Graham et al. 2007).

2.6. Mécanismes expliquant l'effet de la RBP4 dans la résistance à l'insuline

Les mécanismes par lesquels la RBP4 induit une résistance à l'insuline ne sont pas bien compris. Il existe une corrélation évidente entre l'expression (mRNA) augmentée de l'adipokine RBP4 et la concentration sérique élevée de RBP4 chez l'animal insulino-résistant (Yang et al. 2005) et chez des humains obèses et diabétiques de type 2 (Graham T. E. et al. 2006c, Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010). Cependant la contribution exacte de la RBP4 venant du tissu adipeux à la concentration sérique totale de RBP4 n'est pas connue. Puisque la majorité de la RBP4 dans la circulation est d'origine hépatique, il est concevable que le foie aussi puisse contribuer à l'excès de RBP4 sérique, dans des conditions de résistance à l'insuline et diabète de type 2. Il n'est toujours pas clair si l'adipokine RBP4 transporte aussi du ROL (holo-RBP4) ou une autre molécule possiblement capable d'engendrer de l'insulino-résistance. Cependant,

certaines études ont démontré que de la RBP4 d'origine extra-hépatique peut lier du ROL et de la TTR dans la circulation (Quadro L et al. 2004, Quadro L et al. 2003). Certains auteurs considèrent l'apo-RBP4 (sans ROL) comme étant plus réactive et plus susceptible d'induire de la résistance à l'insuline (Erikstrup et al. 2009), (Mills et al. 2008). D'autres auteurs considèrent que les deux formes de RBP4 (apo- et holo-) peuvent engendrer de la résistance à l'insuline dans les adipocytes en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, via les voies JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et TLR4 (« *toll like receptor 4* »), (Norseen et al. 2012). Une autre hypothèse attribuerait la résistance à l'insuline plutôt au holo-RBP4 (RBP4 avec ROL) qu'au apo-RBP4 (RBP4 sans ROL). Cette possibilité est soutenue par le fait qu'une molécule non-rétinoïde (A1120) se lie au RBP4 et diminue sa concentration sérique, mais sans amélioration de la résistance à l'insuline (Motani et al. 2009). Alors que des rétinoïdes comme la fenrétinide diminuent la concentration de RBP4 sérique et la résistance à l'insuline, possiblement par un mécanisme rétinoïde-dépendant (Preitner et al. 2009, Yang et al. 2005). Un autre fait évocateur d'un mécanisme rétinoïde-dépendant : dans la résistance à l'insuline, la RBP4 sérique augmentée est associée à l'expression hépatique augmentée du PEPCK, un gène contrôlé par l'AR (Lucas PC et al. 1991), ce qui stimule la sécrétion hépatique de glucose dans le sang, augmentant la glycémie (Yang et al. 2005).

Il a été démontré qu'une concentration sérique élevée de RBP4 diminue la sensibilité à l'insuline dans les muscles, possiblement par l'inhibition du récepteur membranaire à l'insuline (IR) et son substrat IRS1 (Tamori et al. 2006). Dans des cultures de pré-adipocytes humaines, la RBP4 inhibe la phosphorylation d'IRS1, bloquant ainsi la signalisation de l'insuline (Ost et al. 2007). D'autres recherches démontrent une dépendance de la RBP4 à un autre système impliqué dans l'homéostasie du glucose, le cAMP-HMGA1-RBP4, qui engage le gène « *high mobility group A1* » HMGA1 (Chiefari et al. 2009). Même la TTR a été trouvée élevée chez des souris ob/ob insulino-résistantes, ce qui suggère une influence de la TTR sur la résistance à l'insuline via des particularités du lien RBP4-TTR (Berry et al. 2012a). Une autre étude a impliqué une contribution du fer, dans la résistance à l'insuline causée par la RBP4 (Fernandez-Real et al. 2008). Certains suggèrent que la holo-RBP4 (ROL-RBP4) active la cascade STRA6/JAK2/STAT5, favorisant l'expression du gène SOCS3, un inhibiteur de la signalisation de l'insuline (Berry et al. 2012a, Berry et al. 2012b, Berry et al. 2011, Berry and Noy 2012, Berry et al. 2012c). Le STRA6 lie la holo-RBP4 extracellulaire et transfère le rétinol à sa

protéine de liaison de rétinol cellulaire associée, la CRBP. Ce transfert de ROL qui active le STRA6 déclenche aussi une cascade de signalisation médiée par une kinase, la « *Janus kinase 2* » ou JAK2 et ses facteurs de transcription associés : les traducteurs de signaux et activateurs de transcription 3 (STAT3) ou STAT5. Le STAT activé, est transféré dans le noyau où il induit l'expression de son gène cible, un suppresseur de signalisation pour cytokines, SOCS3 (« *suppressor of cytokine signalling 3* »), qui est aussi un inhibiteur de IRS1. Il apparaît que le STRA6 peut ainsi indirectement inhiber les réponses à l'insuline, à travers cette cascade. L'activation du STRA6 s'arrête lorsque le CRBP, qui a reçu et lié le ROL, se dissocie du STRA6 et délivre le ROL aux enzymes spécifiques dans la cascade métabolique intracellulaire des rétinoïdes. Par conséquent le STRA6 fonctionne comme une cytokine de transport et signalisation qui implique l'homéostasie et le métabolisme de la vitamine A dans les signalisations cellulaires (Noa Noy 2015, 2016). Quels que soient les mécanismes, plusieurs interventions ayant diminué la résistance à l'insuline chez l'humain, dont l'activité physique, ont été accompagnées d'une diminution de la concentration de RBP4 sérique (Balagopal et al. 2007, Haider et al. 2007, Kovacs et al. 2007, Lim et al. 2008). Plus d'études sont nécessaires pour élucider les mécanismes de ces améliorations, afin d'établir la part des associations, des causes et des conséquences, et ouvrir des pistes thérapeutiques.

2.7. Essais de gestion de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2

Une meilleure compréhension des mécanismes biomoléculaires impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline, a orienté les recherches pour trouver des traitements mieux ciblés pour contrôler le diabète de type 2. Quelques avenues intéressantes pourraient être de: diminuer l'état d'inflammation chronique, diminuer la sécrétion d'adipokines impliquées dans la résistance à l'insuline, privilégier les acides gras non-saturés dans l'alimentation afin d'améliorer le métabolisme des lipides dans les muscles, privilégier la consommation d'antioxydants afin de diminuer le stress oxydatif, faire plus d'exercice physique, garder un poids santé. Également, la recherche reconnaît de plus en plus l'implication de la vitamine A et de diverses molécules reliées aux rétinoïdes, dans plusieurs aspects métaboliques touchant l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, particulièrement via la biologie des tissus adipeux (Frey and Vogel 2011, Rhee Plutzky 2012).

CHAPITRE 3 – La vitamine A dans l'obésité et le diabète de type 2

3.1. Les rétinoïdes contrôlent la biologie des tissus adipeux

Plusieurs recherches suggèrent que les diverses formes de la vitamine A (ROL, RE, RAL et AR) sont impliquées dans l'adipogenèse, l'homéostasie du glucose et la dépense énergétique (Bonet et al, 2012). Dans le tissu adipeux, la vitamine A est active particulièrement sous forme d'AR (Petkovich PM 2001). Le récepteur de l'acide rétinoïque RXR forme des dimères avec le PPAR γ , ce qui permet une grande influence de l'acide rétinoïque sur l'adipogenèse (Frey and Vogel 2011). Toutefois un excès de RAL, un métabolite intermédiaire du ROL, peut inhiber le PPAR γ (Ziouzenkova O et al. 2007a). L'adipogenèse est régulée par un complexe de cascades de signalisation, où le facteur PPAR γ est une protéine absolument nécessaire pour que la différenciation des adipocytes puisse commencer (Rosen and Spiegelman 2001). Alors une inhibition indirecte du PPAR γ , comme celle dont le RAL a été démontré capable, peut inhiber l'adipogenèse (Ziouzenkova O. et al. 2007b). Diverses études ont révélé des perturbations du métabolisme de la vitamine A dans l'obésité et le diabète, sans qu'une carence alimentaire en vitamine A ait été en cause (Trasino and Gudas 2015). Par exemple l'activité des enzymes, dont les REH pour hydrolyser des RE en ROL, est diminuée chez les rats diabétiques (Chen M. et al. 2003). Autre signe d'une diminution d'activité enzymatique dans le métabolisme du ROL, les concentrations de ROL étaient augmentées dans le sang, les tissus adipeux et les muscles de nos souris obèses et diabétiques *ob/ob* (Manolescu et al. 2010, 2012, 2013, 2015). Tout ceci peut contribuer à la diminution de la production endogène normale d'AR (Figure 8). Chez des patients obèses et diabétiques, les niveaux circulants de RE (précurseur de ROL) sont plus élevés que chez des sujets normaux (Wako et al. 1986). Les niveaux sériques de ROL étaient augmentés chez des patients prédiabétiques (Tavridou et al. 1997). Une déficience en vitamine A est également néfaste, car elle diminue significativement la néoglucogenèse chez des rats (Zhao S et al. 2012). La néoglucogenèse à partir du glycérol provenant de l'hydrolyse des triglycérides se produit dans le foie. Il est donc logique de penser qu'un blocage à long terme de cette néoglucogenèse pourrait favoriser les stéatoses hépatiques, positivement associés à la RI. Une diète enrichie en vitamine A contribuait à diminuer l'adiposité viscérale et le poids corporel chez les rats obèses, tout en améliorant leur sensibilité à l'insuline (Jeyakumar et al. 2011, Jeyakumar et al. 2017). Le tissu adipeux sécrète activement des adipokines (Duncan et al.

2007, Frayn et al. 2006, Kahn and Flier 2000) et diverses hormones impliquées dans le syndrome métabolique, la RI et le développement du diabète de type 2 (Catalán et al. 2009a, Catalán et al. 2009b, Tönjes et al. 2010). Parmi elles la RBP4, dont une concentration sanguine augmentée a été associée à l'obésité, à la RI et au diabète de type 2 (Park et al. 2012, Yang et al. 2005). Des ratios sanguins élevés RBP4:ROL ont été associés à la RI et au diabète, suggérant l'augmentation de l'apo-RBP4 (sans ROL) - possiblement plus réactive - dans la circulation (Erikstrup et al. 2009). De plus les tissus adipeux ont des localisations différentes (ex.: sous-cutanée versus viscérale) (Gesta et al. 2006, Peinado et al. 2010) et le métabolisme de la vitamine A dans ces tissus varie selon leur topographie (Sima A et al. 2011). On retrouve également de grandes différences métaboliques entre le tissu adipeux blanc (WAT) et le tissu adipeux brun (BAT) (Enerbäck 2009, 2010a, b). Il est important de continuer les recherches sur le métabolisme des rétinoïdes dans l'obésité, la RI et le diabète (Rosen and MacDougald 2006). Ce chapitre résume plusieurs études et données en la matière.

3.1.1. Apport des rétinoïdes aux tissus adipeux

Partant du foie, la vitamine A (ROL) circule dans le sang lié à sa protéine de transport RBP4 et à la TTR dans un complexe d'environ 71kDa, et se rend aux tissus cibles dont les tissus adipeux. Les concentrations homéostatiques de la holo-RBP4 (ROL-RBP4) dans le sang avoisinent 2-3 μ M (Frey and Vogel 2011, Vogel et al. 1999). Le ROL est ensuite transféré dans les adipocytes via un récepteur membranaire spécifique, le STRA6. Après les repas, des RE et du β -carotène circulent dans le sang étant liés aux chylomicrons, à des résidus de chylomicrons, à des lipoprotéines à basse densité (LDL) et à des lipoprotéines à très basse densité (VLDL). Leurs rétinoïdes sont partiellement absorbés par le tissu adipeux, leur absorption étant facilitée par l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL), d'origine adipocytaire. De petites quantités de rétinyl- β -glucuronidés et d'AR lié à l'albumine circulante peuvent compléter l'apport de rétinoïdes aux adipocytes (Li Y. & Blaner et al. 2014, O'Byrne SM et al. 2013, Kurdianski SB et al. 1995, van Bennekum et al. 2000). En plus du foie, les adipocytes peuvent entreposer des RE jusqu'à concurrence d'approximativement 20 % de tous les rétinoïdes du corps (Tsutsumi et al. 1992). Ces dépôts adipeux de RE, servent de réserve pour maintenir l'homéostasie de la vitamine A, advenant des déficiences ou dysfonctions majeures au niveau du foie, qui est la principale réserve de vitamine A de l'organisme (O'Byrne SM et al. 2005). L'estérification du ROL en RE

est faite par les enzymes de type acyltransférase (ARAT, DGAT1 et LRAT) alors que les RE hydrolases (REH) font le travail contraire (Blomhoff and Blomhoff 2006, Frey and Vogel 2011, Orland et al. 2005).

3.1.2. Oxydation réversible du ROL en RAL dans les tissus adipeux

Le ROL disponible dans les adipocytes provient de la circulation, par l'apport du complexe ROL-RBP4, et aussi par l'hydrolyse enzymatique des réserves adipocytaires de RE. Dans les adipocytes, le ROL peut être converti en rétinaldéhyde (RAL). Cette réaction oxydative réversible est catalysée par des enzymes alcool déshydrogénases (**ADH1**) appartenant à la famille enzymatique MDR et également par des enzymes rétinol déshydrogénases type 1 (**RDH1**) appartenant à la famille enzymatique SDR (Parés et al. 2008). L'ADH1 est bien exprimée dans le tissu adipeux, alors que la RDH1 est prédominante dans le foie. Des souris transgéniques dépourvues de l'expression du gène RDH1 (RDH1-KO) nourries avec une diète pauvre en vitamine A (< 4IU/g), sont devenues obèses (Zhang M et al. 2007). Ceci pourrait être partiellement expliqué par une diminution de la production de RAL et l'expression augmentée du gène PPAR γ stimulant l'adipogenèse (Frey and Vogel 2011, Lobo et al. 2010, Ziouzenkova O. et al. 2007b). En plus, des enzymes β -carotène-oxygénase (**BCO**) peuvent convertir les molécules de **β -carotène**, en provenance du sérum, en deux molécules de RAL via un clivage enzymatique (BCMO1) central (Fierce et al. 2008, Paik et al. 2004, Redmond et al. 2001), ou vers un seul RAL par clivage enzymatique (BCO2) excentrique (Ziouzenkova O et al. 2007c). Des souris BCMO1-KO ont une homéostasie perturbée de la vitamine A dans les adipocytes associée à l'augmentation de poids et des acides gras libres dans le sang, une dyslipidémie et une stéatose hépatique (Hessel et al. 2007). Le gène BCMO1 est bien exprimé dans les adipocytes adultes et influence le gène PPAR γ par la production de RAL qui peut s'y lier. Le RAL augmente la répression du gène PPAR γ , ce qui diminue l'adipogenèse. Chez des animaux dont la principale source de vitamine A est le β -carotène, l'inactivation du BCMO mène à une diminution de la production de RAL et donc à une baisse de l'inhibition du gène PPAR γ par le RAL. Il en résulte une augmentation de l'expression du gène PPAR γ et une augmentation de la différenciation adipocytaire et de l'adipogenèse (Frey and Vogel 2011, Lobo et al. 2010, Ziouzenkova O. et al. 2007b).

3.1.3. Particularités du RAL dans les tissus adipeux

En conclusion le RAL est capable d'inhiber l'adipogenèse autant *in vitro* qu'*in vivo* (Frey and Vogel 2011). L'inhibition des diverses enzymes qui affectent le RAL (ex.: production par ADH1, RDH1, BCO et/ou oxydation par RALDH1) amène une baisse ou une augmentation de la concentration de RAL dans les adipocytes; il en résulte une augmentation ou une diminution de l'obésité respectivement (Ziouzenkova O et al. 2007a, Ziouzenkova O. et al. 2007b). En effet, le RAL semble jouer le rôle d'un régulateur transcriptionnel, en se liant aux récepteurs nucléaires PPAR et RXR et en réprimant leur activation. Ainsi, plus de RAL conduit à une diminution d'expression du gène PPAR γ avec comme conséquence la diminution de la différenciation adipocytaire, de l'adipogenèse et de l'obésité (Ziouzenkova O et al. 2007a).

3.1.4. Production d'acide rétinoïque dans les tissus adipeux

Dans les cellules, le rétinaldéhyde (RAL) est ensuite oxydé de façon irréversible pour produire de l'acide rétinoïque (RA). La réaction est catalysée par les enzymes rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH) présentes dans les adipocytes matures (Duester et al. 2003, Gagnon et al. 2003, Marchitti et al. 2008, Sima et al. 2011). Chez des souris RALDH1^{-/-}, les concentrations de ROL et RAL augmentent dans les adipocytes (Ziouzenkova O et al. 2007a), accompagnées d'une diminution de l'adipogenèse (Reichert et al. 2011). Ces souris RALDH1-KO présentent un poids diminué, une meilleure sensibilité à l'insuline et une meilleure glycémie que les témoins, même avec une diète riche en gras (Ziouzenkova O et al. 2007a). Donc l'enzyme RALDH1 peut influencer indirectement l'adipogenèse. Son inhibition mène à une plus grande concentration de RAL dans les adipocytes, ce qui inhibe l'expression des gènes PPAR, avec comme conséquence une diminution de l'adipogenèse et de l'obésité (Ziouzenkova O. et al. 2007b). Chez des souris, une plus grande expression (mARN) de la RALDH1 a été observée dans les préadipocytes du tissu adipeux viscéral (VF) comparativement au tissu adipeux sous-cutané (SF) (Gesta et al. 2006). Ceci n'a pas été confirmé au niveau protéinique (Peinado et al. 2010). Le contraire a été observé dans les cellules adipeuses matures, avec une plus grande quantité de RALDH1 dans le SF que dans le VF (Sima et al. 2011). Une augmentation de la RALDH2 a été observée dans les fractions vasculaires stromales (SVF) du SF aux deux niveaux, génique et protéinique (Peinado et al. 2010). Il est donc possible que dans certaines circonstances, les préadipocytes du VF produisent plus d'AR que les préadipocytes du SF. Il est

connu que l'AR possède un effet répressif sur l'adipogenèse précoce (Bonet et al. 2003). Les tissus adipeux SF et VF possèdent des capacités différentes de maturation de leurs préadipocytes, dépendamment de leur production d'AR (Adams et al. 1997). Les niveaux des fractions vasculaires stromales (SVF) sont différents entre le SF et le VF, ce qui influence leur adipogenèse (Peinado et al. 2010).

3.1.5. Protéines de liaison des rétinoïdes (CRBP) dans les tissus adipeux

Les protéines cellulaires de liaison des rétinoïdes (CRBP), protègent le ROL des isomérisations ou oxydations aléatoires par radicaux libres. Elles lient et présentent de façon appropriée le ROL aux enzymes d'estérification vers les RE et/ou aux enzymes d'oxydation vers le RAL et ensuite vers l'AR (Noy 2000), augmentant ainsi l'efficacité de toutes ces réactions (Blomhoff and Blomhoff 2006, Napoli JL 2000, Ross AC 1993a, b). Trois sous-types de CRBP (**CRBP-1, 2, 3**) ont été identifiés chez la souris (Ong 1994, Piantedosi et al. 2005, Vogel et al. 2001) appartenant à la même famille de protéines intracellulaires de liaison des lipides (iLBP) que les protéines cellulaires de liaison d'acide rétinoïque (CRABP) et les protéines cellulaires de liaison d'acides gras (FABP) (Noy 2000). Les CRBP-1 et CRBP-3 sont exprimées dans le gras de souris et facilitent grandement l'estérification du ROL vers les RE, sous l'action catalytique des enzymes LRAT et/ou ARAT (Piantedosi et al. 2005). Les souris CRBP-1/KO ont montré une estérification hépatique réduite accompagnée d'une diminution de 50 % de leurs réserves hépatiques de RE (Matt et al. 2005). Les souris CRBP-3/KO présentent une estérification hépatique réduite, en plus d'un appauvrissement du lait en RE (Frey and Vogel 2011, Piantedosi et al. 2005). Les CRBP-1 et CRBP-3, ont une grande similitude dans leurs structures d'acides aminés, mais la CRBP-1 possède deux fois plus d'affinité pour le ROL et est exprimée seulement dans les préadipocytes, alors que la CRBP-3 est exprimée aussi dans les cellules endothéliales et dans les adipocytes matures (Caprioli et al. 2004, Frey and Vogel 2011, Piantedosi et al. 2005).

Dans la biologie du tissu adipeux, les CRBP-1 et CRBP-3 sont bien impliquées dans le métabolisme énergétique (Vogel et al. 2001, Zizola et al. 2010, Zizola et al. 2008). La concentration sérique en rétinoïdes n'est pas diminuée chez les souris CRBP-3/KO. Lorsque nourris avec une diète riche en gras (HFD), ces animaux montrent une différenciation adipocytaire et une adipogenèse réduites, une diminution d'acides gras libres (FFA) dans la

circulation, une accumulation réduite des triglycérides (TG) dans le foie et moins des stéatoses hépatiques que les souris témoins (Zizola et al. 2010, Zizola et al. 2008). De plus, l'expression de certains gènes impliqués dans l'oxydation mitochondriale d'acides gras dans le gras brun (BAT), était augmentée. Il semblerait que le CRBP-3 soit aussi un gène cible pour le récepteur PPAR γ et qu'il favorise la différenciation adipocytaire vers des cellules adipeuses matures. Son inhibition est associée à une diminution de l'adipogenèse, via une diminution de l'expression et de l'activité des PPAR γ . La CRBP-3 est très bien, ou si vous voulez fortement, exprimée dans les étapes tardives de la différenciation cellulaire (Zizola et al. 2008). La concentration sérique en rétinoides n'est pas diminuée non plus chez les souris CRBP-1/KO (Frey and Vogel 2011, Zizola et al. 2010). Par contre, ces souris CRBP-1/KO ont présenté une adipogenèse augmentée, dans le contexte d'une diète riche en gras (HFD), tout en restant sensibles à l'insuline et tolérantes au glucose par comparaison aux témoins. Ceci pourrait être l'effet d'un plus grand nombre d'adipocytes de taille moyenne plus petite (comme c'est le cas dans les tissus BAT) et de niveaux sériques d'adiponectine augmentés (Frey and Vogel 2011, Zizola et al. 2010). L'étude de marqueurs moléculaires spécifiques pour divers stades de différenciation adipocytaire, a montré que l'expression et l'activité du PPAR γ était particulièrement augmentée en absence de CRBP-1 autant *in vivo* qu'*in vitro* (Zizola et al. 2010). Il semblerait que la CRBP-1 peut inhiber la différenciation et la maturation de pré-adipocytes et que son inhibition induit une adipogenèse augmentée, non pas directement, mais par l'intermédiaire de la stimulation de l'expression et de l'activité des PPAR γ (Zizola et al. 2010). Cela présente une similarité avec le profil de la rétinol saturase (RetSat), une autre enzyme qui est diminuée lorsque l'adipogenèse et l'obésité sont augmentées (Schupp et al. 2009). En conclusion la CRBP-1 est associée avec une adipogenèse diminuée et la CRBP-3 avec une adipogenèse et une obésité augmentées chez la souris (Frey and Vogel 2011).

3.1.6. Transporteurs d'acide rétinolique (CRABP et FABP5) dans les tissus adipeux

Les CRABP1 et 2 sont responsables de la liaison et de la translocation de l'AR dans le noyau, ayant comme cible la liaison et l'activation des récepteurs nucléaires de l'acide rétinolique, les RAR et les RXR (Chambon P 2005). Dans les tissus adipeux, la CRABP-2 est bien exprimée et elle diminue l'adipogenèse par l'inhibition de la différenciation des pré-adipocytes, contrôlée par l'AR via les RAR (Berry et al. 2012b, Berry and Noy 2009). La

FABP5 est également capable de lier l'AR pour livraison intranucléaire afin de lier PPAR β/δ , alors que la CRABP-2 délivre de l'AR pour lier les RAR. Par conséquent, dans les cellules qui expriment plus de CRABP-2, l'AR va activer principalement les RAR, alors que dans les cellules qui expriment plus la FABP5, l'AR va activer principalement les PPAR β/δ et les cascades de signalisation dépendantes respectivement (Berry and Noy 2009). Dans les tissus adipeux, la CRABP-2 est hautement exprimée durant la différenciation adipocytaire précoce, mais elle est réprimée et diminuée dans les stades tardifs caractérisés par une domination de la FABP5. Ceci explique l'effet inhibiteur précoce de l'AR sur la différenciation adipocytaire seulement dans les jeunes préadipocytes (Berry et al. 2010, Frey and Vogel 2011).

3.2 Vitamine A, tissus adipeux et sensibilité à l'insuline

Chez tous les mammifères, la vitamine A influence le développement et les diverses fonctions des tissus adipeux (Bonnet et al 2012). La biologie des tissus adipeux est influencée par l'action de l'AR (Villarroya et al. 2004, Villarroya et al. 1999) et la différenciation des adipocytes est contrôlée via les récepteurs nucléaires d'acide rétinoïque RAR et RXR et leurs divers dimères (ex.: avec les PPAR), (Alemán et al. 2004). Un déficit physiologique en vitamine A et/ou un ralentissement de son métabolisme, semblent favoriser une augmentation des dépôts adipeux (Bonet et al. 2003, Mercader et al. 2007). Les adipocytes sont activement impliqués dans la captation, l'entreposage et le métabolisme des rétinoïdes (Tsutsumi et al. 1992). Certaines études sur des rongeurs obèses et diabétiques rapportent une réduction de la biodisponibilité tissulaire de ROL (Trasino et al. 2015) ou de son métabolisme (Manolescu et al. 2012, 2013, 2015) alors même que les concentrations sanguines de ROL sont augmentées (Manolescu et al. 2010, Trasino et al. 2015). En conditions d'obésité, de RI et de diabète, il pourrait y avoir une diminution progressive de l'entrée du ROL dans certaines cellules et/ou de l'efficacité enzymatique intracellulaire pour produire de l'AR endogène. Ceci diminuerait également le métabolisme oxydatif dans les adipocytes matures, car l'AR y contribue, diminution qui favoriserait l'obésité (Mercader et al 2007). L'inflammation chronique présente dans ces pathologies pourrait y contribuer également. Dans ces conditions, les tissus demanderaient davantage de ROL au foie qui diminuerait ses réserves (RE). Effectivement, un bon indice du ralentissement d'activité enzymatique sur la cascade métabolique des rétinoïdes, serait l'augmentation de la concentration du substrat initial (le ROL) dans le sang et dans les

tissus adipeux, alors que les réserves (RE) diminuent dans le foie. C'est ce que nous remarquons dans nos travaux sur nos souris obèses et diabétiques (Manolescu et al 2010, 2012, 2013, 2015). Chez l'humain aussi des réserves (RE) hépatiques diminuées ont été associées à l'obésité, à la RI et au diabète, mais les concentrations adipocytaires de ROL n'ont pas été évaluées (Trasino and Gudas 2015).

Il est bien établi que l'insuline exerce ses effets biologiques via la phosphorylation et l'activation de son récepteur membranaire (IR). Dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète, la sensibilité du récepteur membranaire IR à l'action de l'insuline est diminuée. L'insuline active plusieurs autres molécules importantes dans le métabolisme du glucose tels que le transporteur cellulaire de glucose GLUT4, la MAPK (« *mitogen-activated protein kinase* ») et la **PI3K** (« *phosphatidylinositol 3 kinase* ») (Furtado et al. 2002, Somwar et al. 2001a, Somwar et al. 2002, Somwar et al. 2001b). L'AR contrôle la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme de l'insuline, dans la différenciation des adipocytes, dans le métabolisme des lipides et dans l'inflammation, via ses récepteurs RAR et RXR en interaction avec d'autres facteurs de transcription, dont des PPAR (Berry et Noy 2009, Lenhard 2001). Le récepteur PPAR γ est abondamment exprimé dans les adipocytes et forme des hétéro-dimères avec les récepteurs RXR α , β and γ , qui y sont également exprimés (Metzger et al. 2005). L'AR *all trans* (mais pas le *9-cis*) est également un ligand de haute affinité pour le PPAR β/δ (mais pas pour les PPAR α et PPAR γ), qui active sa transcription et influence la sensibilité à l'insuline (Shaw N et al. 2003). Plus précisément, lors d'un traitement des adipocytes, l'équipe de Berry et Noy a trouvé que l'AR *all trans* peut lier et activer des RAR et des PPAR β/δ . Des gènes comme **PDK1** ont été ainsi activés via les PPAR β/δ . Ceci prouve un impact de l'AR *all trans* sur la signalisation de l'insuline. Car le **PDK1** influence la **PI3-K** qui contrôle la capacité de l'insuline à activer la voie **PKB/Akt1** dans les adipocytes. De plus, ce traitement à l'AR *all trans* a conduit à la phosphorylation des **Akt1** et **GSK3**, de la même façon qu'un traitement avec insuline. Donc l'AR *all trans* peut augmenter (seul) la voie de signalisation **PKB-Akt**. Un effet inhibiteur de l'adipogenèse avait également été observé en association avec cette activation des PPAR β/δ et RAR (Berry et Noy 2008, 2009, 2012b). En outre, un double traitement avec l'AR *9-cis* et un agoniste pour le PPAR α , augmente (via le RXR/PPAR α) l'efficacité de la voie de signalisation IRS2/PI3-K/PKB/GLUT avec augmentation de la captation de glucose dans une culture de **myocytes** humaines (Bouzakri et al. 2004). C'est pourquoi les récepteurs PPAR, RXR

et RAR et divers hétérodimères sont des cibles moléculaires dans le diabète et plusieurs molécules les activant améliorent l'action de l'insuline (Berry et Noy 2009, Lebovitz and Banerji 2001, Lebovitz et al. 2001).

3.3. Vitamine A, tissus adipeux blanc, bruns et beiges

À la différence des tissus adipeux blancs, les tissus adipeux bruns ou beiges ont plus de mitochondries et un métabolisme énergétique plus actif. Dans ces tissus les adipocytes ont une taille réduite (Figure 18) et des formes polygonales diverses, morphologies histologiques reconnues pour le gras brun/beige (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006, van Marken Lichtenbelt et al. 2009, Wijers et al. 2009). Ayant besoin de plus d'oxygène, les tissus adipeux bruns/beiges sont naturellement et physiologiquement plus vascularisés (avec des capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques) que le tissu adipeux blanc (Kuroshima 1993). L'exposition au froid induit la stimulation sympathique de graisses, autant brunes que blanches, via la norépinéphrine couplée avec les récepteurs bêta-adrénergiques, ce qui promeut l'hydrolyse de triglycérides en acides gras libres et glycérol (Kuroshima 1993). Cependant, dans les adipocytes bruns/beiges, les acides gras sont rapidement oxydés dans les mitochondries, sous l'influence de la protéine spécifique UCP1 (« *uncoupling protein 1* ») et produisent principalement de la chaleur au lieu d'ATP. Ceci fait partie d'un processus connu sous le nom de thermogenèse adaptative (Figure 17) ou thermogenèse sans frissonnements (« *non-shivering thermogenesis* ») (Kuroshima 1993). La signalisation bêta-adrénergique est aussi activée dans le gras beige/brun durant la thermogenèse alimentaire (Figure 17), produisant aussi un dégagement de chaleur (Bachman et al. 2002, Bartelt and Heeren 2014). Ainsi, les gènes pour les UCP sont naturellement exprimés dans le tissu adipeux brun/beige (BAT) plus présent dans le gras sous-cutané, et sont impliqués dans la thermogenèse adaptative et alimentaire. Les mammifères arctiques possèdent la plus grande masse de gras brun, une réponse adaptative aux grands froids. Fait assez intéressant, le foie de ces animaux contient aussi la plus grande quantité de vitamine A par rapport à d'autres mammifères (Senoo et al. 2012). Au moment de son activation (ex.: par exposition au froid et/ou par l'alimentation) la graisse brune/beige contribue à augmenter leur métabolisme statique, non cinétique (Bonet et al. 2013, Mercader et al. 2006). Les PGC1 α et UCP1 sont deux protéines clés connues pour leur implication dans la genèse mitochondriale, l'oxydation des acides gras, la thermogenèse et la dépense énergétique dans les

tissus adipeux bruns/beiges (Chen H. Y. et al. 2013). Alors que traditionnellement l'expression de la UCP1 est reconnue pour être une « signature » moléculaire spécifique pour la graisse brune (Chen H. Y. et al. 2013), le tissu adipeux beige (parfois nommé aussi « *brite* ») est présent chez la souris et l'humain, et exprime les protéines PGC1 α et UCP1 sous diverses influences, y compris celle de l'acide rétinoïque (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Lidell et al. 2013, Lidell et al. 2014, Mercader et al. 2006, Wu J. et al. 2012). Le remodelage du tissu adipeux en blanc, brun ou beige est encore à l'étude (Lee and Cowan 2014) pour déterminer si les adipocytes bruns ou beiges sont différenciés seulement à partir de préadipocytes bruns ou beiges, des myoblastes (Saely et al. 2012), ou s'ils peuvent provenir aussi des adipocytes blancs matures par trans-différenciation (Rosen and MacDougald 2006). La vitamine A, sous forme de fortes doses d'AR, est reconnue pour son implication dans la différenciation et la maturation cellulaires, et pourrait « pousser » certains préadipocytes à devenir beiges/bruns plutôt que blancs, augmentant ainsi leur dépense énergétique (Mercader et al. 2006). Nous avons démontré qu'une petite dose d'AR augmente l'expression (mRNA) des peptides natriurétiques (PN), notamment BNP, dans le muscle cardiaque de souris *ob/ob* diabétiques (Manolescu et al. 2014). Les peptides natriurétiques influencent aussi la différenciation des adipocytes chez l'humain (Bordicchia et al. 2012). Une administration de BNP chez la souris, augmente le nombre de cellules brunes dans le tissu adipeux blanc et accroît la consommation d'oxygène et la dépense d'énergie (Plante et al. 2014b). Les PN sont impliqués dans le fonctionnement du tissu adipeux brun par l'activation de guanylyl cyclases spécifiques, via une liaison aux récepteurs NPR-A et B (Bonet et al. 2013, Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012). Le même effet est produit par le froid, qui induit une augmentation des PN, surtout BNP, dans le plasma, en parallèle avec la thermogenèse dans le BAT. La conversion d'une partie des tissus adipeux en gras brun/beige, ayant un métabolisme énergétique augmenté et sans RI, s'avère un outil attrayant contre l'obésité et le diabète (Bartelt and Heeren 2014).

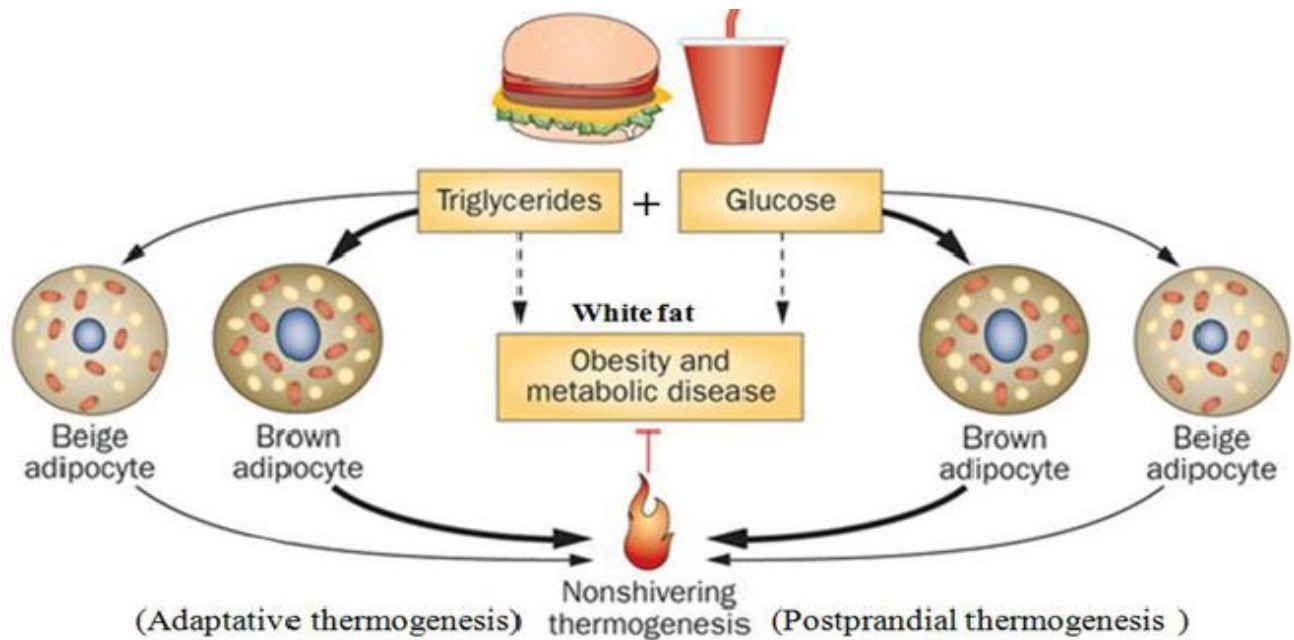


Figure 17. Le métabolisme des gras brun et beige diffère de celui du gras blanc

(adapté de Bartelt &Heeren 2014, Bachman 2002, Kuroshima 1993; disponible en libre accès, citation et adaptations Manolescu DC 2017 sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme FESP Univ de Montréal)

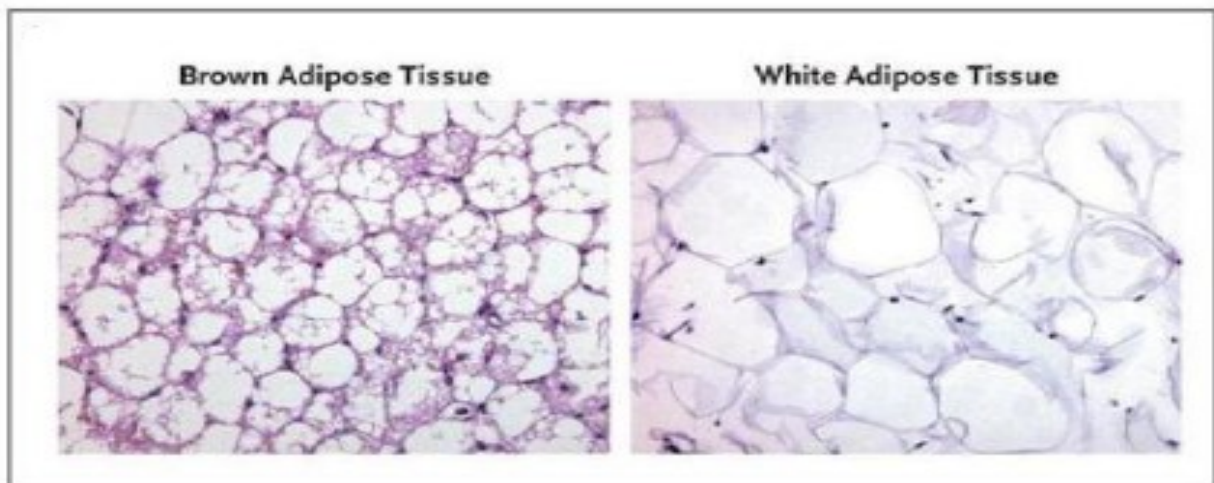


Figure 18. Les adipocytes brunes sont plus petites que les blanches

(Van Marken Lichtenbelt et al 2009;disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs, selon la politique FESP Université de Montréal)

3.4. Vitamine A et sécrétion de l'insuline

La vitamine A influence le développement du pancréas et l'activité des cellules- β sécrétrices d'insuline. Dans l'embryogenèse, les signalisations par l'AR sont absolument nécessaires pour la délimitation des champs endodermes le long de l'axe antéro-postérieur, champs qui mènent au développement de différents organes, dont le pancréas (Bayha et al.2009). Le pancréas se développera à partir de l'endoderme postérieur (Wang et al. 2006) et durant son développement, l'enzyme RALDH2 du mésoderme fournira l'AR nécessaire pour la différenciation du côté dorsal du bourgeon pancréatique (Molotkov et al.2005, Stafford et al.2004). Il est donc clair qu'une déficience en vitamine A, peut causer une réduction du nombre des cellules- β sécrétrices, lors de l'embryogenèse (Matthews et al.2004).

Un manque de vitamine A diminuait la sécrétion de l'insuline dans une culture de cellules- β et l'AR fut trouvé nécessaire pour rétablir cette sécrétion (Chertow and Baker 1978). Dans ce cas, les propriétés anti-oxydantes des rétinoïdes protègent les cellules- β (donc leur fonctionnement) du stress oxydatif excessif, autant au niveau des membranes que des organites intracellulaires (Chertow and Baker 1978). Les cellules- β sont naturellement plus pauvres (que d'autres) en défenses antioxydants endogènes, alors que le T2DM augmente leur stress oxydatif (Meerza D. et al 2016). Lequel stress est accentué lors de carences alimentaires ou de perturbations du métabolisme de rétinoïdes (Meerza D. et al 2016), ce qui augmente l'apoptose dans le pancréas malade, plus que dans d'autres organes (Trasino et al.2015a).

D'autres études ont identifié l'acide rétinoïque comme étant important pour régulariser (9-*cis* AR atténue et *all-trans* AR stimule) la sécrétion d'insuline sous l'influence du glucose dans le pancréas (Brun et al. 2016, Kane et al. 2010). Les mécanismes passent par l'expression (mRNA) des gènes **Glut2** et **Gck** qui sont atténués par 9-*cis* AR et stimulés par *at* -AR, suggérant ainsi un effet des rétinoïdes sur la sensibilité au glucose des cellules- β . Une déficience en vitamine A cause également une perte de cellules- β dans le pancréas adulte, accompagnée d'hyperglycémie (Trasino et al. 2015). Entre autres parce qu'une déficience en vitamine A favorise l'apoptose dans un pancréas malade, plus que dans d'autres organes (Trasino et al.2015a). Ces études suggèrent que la vitamine A joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement des cellules- β sécrétrices d'insuline. Des perturbations dans le métabolisme de la vitamine A peuvent donc affecter le pancréas aussi.

3.5. Vitamine A, métabolisme mitochondrial et résistance à l'insuline

Des études récentes montrent que le ROL est essentiel dans la mitochondrie, car il fonctionne comme un agent de transfert d'électrons (e-) vers le cytochrome C (Hammerling 2016). Le ROL permet l'activation de l'enzyme protéine kinase C- Δ (PKC- Δ) en l'accouplant avec le cytochrome C, en présence de la protéine adaptative P66shc (Acin-Perez et al. 2010a). Ces quatre éléments (cytochrome C, PKC- Δ , protéine P66shc et ROL) forment le complexe de signalisation connu sous le nom de « *signalosome* PKC- Δ /ROL » (Hammerling 2016). L'activation de la PKC- Δ stimule l'activité des phosphatases menant à la déphosphorylation et la diminution de l'activité de la pyruvate déshydrogénase kinase 2 (PDK2), entraînant une augmentation de l'activité du complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDHC) (Acin-Perez et al. 2010a). Le PDHC augmente la conversion du pyruvate en acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) suivie par son entrée dans le cycle de Krebs (TCA-cycle), (Acin-Perez et al. 2010b, Hammerling 2016). La consommation d'oxygène et les productions successives de NAD (+), de NADH et d'ATP sont augmentées (Acin-Perez et al. 2010a). Puisque l'enzyme PKC- Δ a besoin de ROL pour son activation et le contrôle de la phosphorylation oxydative en ciblant le complexe PDHC, il apparaît que la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie dépend de la vitamine A (Acin-Perez et al. 2010b). Une carence ou des perturbations métaboliques d'accès au ROL mènent à la diminution de la respiration et de la production d'ATP, à des dysfonctions mitochondriales avec augmentation du stress oxydatif, à la perte de potentiel de membrane (dépolarisation) et même à la mort mitochondriale (Chiu et al. 2008), (Korichneva et al. 2003). Une réduction en nombre et taille des mitochondries suggère des phénomènes de « fission » précédant leur mort (Lowell and Shulman 2005, Morino et al. 2005, 2008). La mort mitochondriale augmente aussi le stress oxydatif (ROS), reconnu pour contribuer à la RI (Qatanani and Lazar 2007). Ce qui augmente l'apoptose dans un pancréas diabétique malade, plus pauvres en défenses antioxydants endogènes (Trasino et al. 2015a, Meerza D. et al 2016).

3.6. Divers impacts de la vitamine A dans l'obésité et le diabète de type 2

Il y a encore beaucoup d'interrogations sur les liens de la vitamine A avec l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 chez l'humain. Toutefois les modèles animaux montrent clairement que le métabolisme des rétinoïdes est affecté dans ces pathologies. Ainsi des rats obèses supplémentés avec de la vitamine A préformée (RE donnant de 2,6 à 129 mg

ROL/kg), ont perdu du poids de façon significative par rapport au groupe témoins (Jeyakumar et al. 2008, Jeyakumar et al. 2011, Jeyakumar 2017). Toutefois de très grandes doses de RE peuvent devenir toxiques à long terme. A l'opposé, une diète dépourvue de vitamine A fut associée au développement de l'obésité chez les souris (Bonet et al. 2003, Ribot et al. 2001). Un traitement avec des doses variables d'AR, chez différents mammifères obèses et RI (mais non-carencés en vitamine A), est aussi associé à une perte de poids, par la diminution de la masse grasse, ce qui contribue à la diminution de la RI et de l'intolérance au glucose (Bonet L 2012, Manolescu et al. 2010, 2012, 2014, 2015). L'AR inhibe précocement la différenciation des jeunes pré-adipocytes et l'adipogenèse (Shao and Lazar 1997). L'AR mène aussi à une expression diminuée du PPAR- γ dans les jeunes pré-adipocytes et à une adipogenèse diminuée (Berry and Noy 2009, Ziouzenkova O et al. 2007a). Il semblerait que l'effet anti-adipogenèse de l'AR se manifeste seulement dans les jeunes pré-adipocytes, mais pas dans les stades tardifs de la différenciation cellulaire (Berry et al. 2010, Frey and Vogel 2011). En effet, dans les stades tardifs l'ajout d'AR n'inhibe plus l'adipogenèse (Lobo et al. 2010, Xue et al. 1996). Dans les adipocytes matures, l'AR stimule plutôt la lipolyse et influence la production de plusieurs adipokines sécrétées en culture (Frey and Vogel 2011). L'effet inhibiteur exclusif de l'AR sur la différenciation des jeunes pré-adipocytes peut provenir de la dynamique différente des deux transporteurs d'AR dans le noyau, la CRABP-2 et la FABP-5. En effet la CRABP-2 cible les récepteurs RAR et la FABP-5 cible les récepteurs PPAR β/δ , mais la CRABP-2 est hautement exprimée seulement à un stade précoce de différenciation des jeunes pré-adipocytes. L'inhibition de l'adipogenèse aux stades tardifs de différenciation adipocytaire est médiée par d'autres cascades de signalisation, cette fois reliées aux récepteurs PPAR β/δ (Berry and Noy 2009). Notre traitement avec une petite dose d'AR diminue la RBP4 sérique, la résistance à l'insuline et la concentration de ROL sérique et tissulaire chez des souris ob/ob (Manolescu et al. 2010, 2012, 2013, 2015). Le tissu adipeux est différemment associé, par topographie, à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2. Ainsi le tissu adipeux viscéral (VF) est plus impliqué dans ces maladies que le tissu adipeux sous-cutané (SF). Ces tissus diffèrent aussi par le rythme de différenciation de leurs pré-adipocytes (Adams et al. 1997, Tchkonina et al. 2006, Tchkonina et al. 2013), par leurs productions d'AR (Sima A et al. 2011) et leurs réponses à l'AR (Bonet et al. 2012). Rappelons que ces deux tissus adipeux ont aussi des fractions stromales-vasculaires différentes (Peinado et al. 2010).

3.7. Vitamine A, physiologie cardiaque et peptides natriurétiques ANP et BNP

Nous avons vu l'importance de l'acide rétinoïque pour le développement du cœur chez l'embryon (Niederreither et al. 2001). L'acide rétinoïque est également très important dans la prévention de plusieurs maladies cardiaques ainsi que dans le remodelage cardiaque (D'Ambrosio et al. 2011, Pan and Baker 2007). Ainsi un traitement à l'AR peut atténuer l'hypertrophie des cardiomyocytes (Wang HJ et al. 2002) et la sécrétion de collagène des fibroblastes cardiaques (He et al. 2006) *in vitro* et *in vivo* (D'Ambrosio et al. 2011). Leurs hypothèses suggèrent la voie de l'angiotensine 2 (ANG-II) connue pour son implication dans la prolifération des fibroblastes cardiaques néonatales, la synthèse du collagène et l'hypertrophie de cardiomyocytes. L'AR s'est également avéré efficace dans la prévention du remodelage pathologique du cœur des rats après un infarctus cardiaque ou un bandage constrictif aortique hypertensif (Choudhary et al. 2008b, Paiva et al. 2005). L'infarctus cardiaque expérimental est également associé à une augmentation du métabolisme et des besoins en rétinoïdes dans le cœur, avec comme conséquence une augmentation significative de transfert du rétinol du foie vers le cœur (D'Ambrosio et al. 2011, Palace et al. 1999). Également, une déficience en rétinoïdes dans le cœur des rats a été associée à du remodelage pathologique et une dysfonction ventriculaire (Azevedo et al. 2010). Ces observations suggèrent que l'AR pourrait être un agent préventif des hypertrophies ou remodelages cardiaques pathologiques, dans les maladies ayant des complications cardiovasculaires, comme l'obésité et le diabète de type 2. Ceci suggère que d'autres systèmes impliqués dans le remodelage cardiaque, comme ceux qui dépendent des peptides natriurétiques (ANP, BNP), pourraient éventuellement être influencés par l'AR. C'était donc intéressant à explorer.

Le cœur sécrète ces deux peptides natriurétiques (PN), de l'ANP (« *atrial natriuretic peptide*») et du BNP (« *brain natriuretic peptide*»), des hormones avec une grande similarité de structure, découvertes dans les années 80 (de Bold et al. 1981). Elles influencent, entre autres, l'homéostasie de la pression artérielle (Lafontan et al. 2005), la fonction rénale et le remodelage du muscle cardiaque (Bartels et al. 2010, Tamura et al. 2000). Elles sont également impliquées dans le métabolisme énergétique avec un effet lipolytique dans les adipocytes dû à l'activation de la dégradation des triglycérides (Sengenès et al. 2005), et à l'induction de la graisse brune/beige (Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012). Ce contrôle de la lipolyse

commence par le lien des PN aux récepteurs spécifiques aux peptides natriurétiques (NPR), ce qui va activer la voie de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP). L'augmentation intracellulaire de cGMP va activer une protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). Cette activation conduit à la phosphorylation de la périlipine A (protéine enveloppant la gouttelette lipidique) et de la lipase hormonosensible (HSL) avec induction de la lipolyse (Lafontan et al. 2005). L'administration intraveineuse des ANP et BNP augmente la mobilisation des lipides (Lafontan et al. 2005). Un autre traitement avec la BNP a réduit significativement le développement de l'obésité, de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline chez des souris obèses et diabétiques de type db/db (Plante et al. 2014b). A l'inverse, des taux diminués de PN dans le plasma sont associés à l'obésité, au syndrome métabolique et au diabète de type 2 (Moro 2013). Divers mécanismes sont impliqués dans le rôle protecteur des PN par rapport au diabète et à l'obésité. La voie de signalisations PN/GMPc/PKG est associée à une augmentation de l'activité mitochondriale et de la dépense énergétique, ayant comme conséquence une diminution de poids (Miyashita et al. 2009). Les PN augmentent la capacité d'oxydation et de dépense énergétique dans les muscles (Mitsuishi et al. 2008, Miyashita et al. 2009). La sensibilité à l'insuline des tissus périphériques s'en trouve par conséquent améliorée. L'ANP et le BNP augmentent les niveaux d'adiponectine, *in vitro* et *in vivo* (Tsukamoto et al. 2009, Yamaji et al. 2009). Les PN sécrétés par le cœur vont stimuler la dégradation des triglycérides des adipocytes et donc la lipolyse avec augmentation systémique du glycérol et des acides gras non estérifiés (AGNE) utilisés par les muscles (Lafontan et al. 2005, Sengenès et al. 2005). Les peptides ANP et BNP peuvent activer le métabolisme de la graisse brune (Whittle and Vidal-Puig 2012). Ils peuvent induire la formation de gras beige/brun et son fonctionnement en activant la cascade des signalisations cGMP/PKG/p38MAPK/PGC1 α /UCP1 (Bonet et al. 2013, Bordicchia et al. 2012). Les adipocytes de type brun expriment l'UCP1, une protéine impliquée dans l'oxydation des acides gras et la dissipation de l'énergie cellulaire sous forme de chaleur. Ainsi, les PN établissent un lien métabolique entre les adipocytes (lipolyse et sécrétion d'adipokines), les tissus adipeux blancs et bruns, les muscles et les cardiomyocytes (Moro and Lafontan 2013). Le niveau d'ANP et de BNP est réduit chez les sujets obèses (Moro 2013). L'expression (mRNA) des ANP et BNP dans le muscle cardiaque de souris obèses et diabétiques, est augmentée par un traitement à l'AR (Manolescu et al. 2014). Une augmentation des PN se traduit par une dépense énergétique et une oxydation accrues des lipides dans les

muscles, associées à une expression augmentée des gènes spécifiques, comme les PGC1 α et PPAR (Engeli et al. 2012, Miyashita et al. 2009). La stimulation de la voie PN/cGMP/PKG/p38MAPK/PGC1 α accentue la genèse des mitochondries et diminue leurs dysfonctions induites par l'hyperglycémie (Mitsuishi et al. 2008, Miyashita et al. 2009). Des taux élevés de PN protègent contre la RI car l'activation de la voie de signalisation PN/cGMP/PKG diminue la masse adipeuse et la RI (Bonet et al 2013, Morino et al. 2006).

La BNP possède également un effet cardio-protecteur qui prévient l'hypertrophie, la fibrose et l'apoptose des cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). Ceci est démontré par le fait que la fibrose cardiaque est un phénotype dominant chez les souris qui manquent de BNP (KO) (Tamura et al. 2000). Ils suggèrent que la BNP pourrait avoir aussi une action antifibrotique locale **directe** dans les ventricules, par la voie de son récepteur GC-A (« *guanylyl cyclase-A* ») ventriculaire, et finalement en stimulant la concentration intracellulaire de cGMP. Ceci parce que, selon eux, la BNP est produite naturellement comme réponse de protection contre une surcharge ventriculaire (Tamura et al. 2000). Ainsi toute molécule stimulant la synthèse de BNP co-participe à son effet cardio-protecteur. C'est le cas du facteur de transcription GATA4 qui stimule la production des ANP et BNP, contribuant ainsi aux effets protecteurs anti-fibrotiques et anti-apoptotiques (Rysä et al. 2010), (Huang et al. 2008). Le GATA4 coparticipe aussi à la différenciation des cardiomyocytes stimulée par l'ocytocine (Jankowski et al. 2004). L'ocytocine (OT) stimule, à son tour, la production des peptides natriurétiques ANP et BNP (Gutkowska et al. 1997) et de l'oxyde nitrique (NO) (Danalache et al. 2007). Le NO est un autre stimulateur de la voie cGMP/PKG et possède un effet cardio-protecteur aussi (Ignarro et al. 1999). Il a également été observé qu'une restriction calorique influence les mitochondries par la voie NO/cGMP et qu'un traitement avec GMPc augmente l'oxydation d'acides gras dans les myotubes (Mitsuishi et al. 2008). Il était donc intéressant de voir quel effet l'AR pourrait avoir sur la synthétase endothéliale d'oxyde nitrique (eNOs), et éventuellement sur d'autres systèmes impliqués dans le remodelage cardiaque, comme ceux qui dépendent des peptides natriurétiques (ANP, BNP). Il était donc utile d'examiner l'effet de l'AR sur l'axe ocytocine-peptides natriurétiques, OT-NPs-ANP-BNP-eNOs, ainsi qu'explorer davantage son impact sur des morphologies cardiaques à risque (ex.: fibroses) en contexte d'obésité et de diabète de type 2.

DEUXIÈME PARTIE : PROJET, TRAVAUX, MANUSCRITS ET PUBLICATIONS

CHAPITRE 4. Projet : L'AR dans le traitement du diabète chez la souris ob/ob

- Impacts de notre traitement à l'AR sur les souris ob/ob obèses et diabétiques –

4.1. Introduction

L'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2, sont des troubles métaboliques qui augmentent de façon épidémique (OMS). La RI, la sécrétion d'insuline perturbée, la dyslipidémie, la dysglycémie, les stéatoses hépatiques et l'athérosclérose apparaissent progressivement dans ces pathologies (DeFronzo 2004, Kahn and Flier 2000, Rajala and Scherer 2003). En dépit de nombreuses recherches, il n'y a pas de guérison pour ces états. Toute nouvelle recherche, thérapeutique et/ou préventive est donc importante.

La vitamine A est un nutriment hautement bioactif, impliqué dans la reproduction, l'embryogenèse, la différenciation cellulaire, la croissance, la vue (Blomhoff and Blomhoff 2006, Gottesman M. E. et al. 2001b). Elle se présente sous diverses formes, avec des structures et des activités spécifiques, soit les rétynyl-esters (RE), le rétinol (ROL), le rétinal (RAL) et l'acide rétinoïque (AR) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Giguère 1994, Napoli JL 1999). Deux isoformes d'acide rétinoïque, soit le 9-*cis* et le all-*trans*, (Giguère 1994, Mangelsdorf 1994, Zhang XK et al. 1992) sont capables de lier et activer les récepteurs nucléaires RAR et RXR dans les cellules cibles (Chambon P. 1996, De Luca LM et al. 1980). Plusieurs recherches ont prouvé l'implication de la vitamine A et de ses métabolites dans la régulation de l'adipogenèse (Reichert et al. 2011, Tsutsumi et al. 1992, Villarroja 1998, Villarroja et al. 1999), et ont suggéré qu'elle pouvait être impliquée dans la sensibilité à l'insuline (Jeyakumar et al. 2011) et l'homéostasie du glucose (Kane et al. 2011). Le RAL, qui est le précurseur de l'AR, peut inhiber l'adipogenèse *in vitro* en supprimant les réponses des RXR alors qu'*in vivo*, chez la souris, il est associé à une réduction de la masse grasse et une meilleure sensibilité à l'insuline (Ziouzenkova O. et al. 2007b). Des concentrations sériques élevées du transporteur hépatique de ROL, la RBP4 (également une adipokine) sont associées à l'obésité et la résistance à l'insuline (Graham TE et al. 2006b, Yang et al. 2005). Les concentrations sériques de vitamine A sous forme d'esters de rétinol, sont élevées aussi chez les obèses diabétiques (Wako et al. 1986). L'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A, est essentiel pour l'embryogenèse et le maintien des structures épithéliales (Ross S. A. et al. 2000b). Plusieurs

fonctions de l'AR s'accomplissent par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires RAR et RXR (Chambon P. 1996). Des recherches cliniques ont démontré son action favorable dans la leucémie myéloïde (Haferlach et al. 1993, Warrell et al. 1991). Même si l'AR est un agent anticancéreux démontré (Freemantle et al. 2003, Petkovich PM 2001), son efficacité dans les troubles métaboliques comme la résistance à l'insuline et le diabète, demeure incomprise car insuffisamment explorée.

La RBP4 est connue comme étant le transporteur de ROL dans la circulation sanguine (Blaner W. S. 1989). Cette protéine est synthétisée dans le foie où elle se lie de façon équimolaire avec le ROL, pour être ensuite libérée dans la circulation (Blaner W. S. 1989, Monaco et al. 1995). Lors de sa libération du foie le ROL-RBP4 se lie avec la TTR, formant un complexe d'un poids moléculaire de 71-kDa, ce qui lui évite une filtration hâtive par le rein (Monaco et al. 1995, Sporn et al. 1986). Outre que dans le foie, la RBP4 est aussi synthétisée par le tissu adipeux et libérée dans le sang à l'instar d'autres adipokines (Tsutsumi et al. 1992). Il a été démontré que les concentrations sanguines de RBP4 sont élevées chez des souris insulino-résistantes, et que leur réduction s'accompagne d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Yang et al. 2005). Les hautes concentrations sanguines de RBP4, sont aussi associées à de l'insulino-résistance chez des patients obèses, intolérants au glucose, diabétiques de type 2 ou encore ayant une forte histoire familiale de T2DM (Graham TE et al. 2006b). De plus, une RBP4 sérique augmentée est aussi associée à plusieurs éléments augmentés du syndrome métabolique tels que : l'indice de masse corporelle (IMC), les triglycérides sériques et la pression sanguine (Klötting et al. 2007). Également, l'activité physique est accompagnée d'une diminution de la résistance à l'insuline et d'une diminution de la concentration de la RBP4 circulante. Plusieurs études diversifiées chez l'humain, ont également trouvé des associations fortes entre les hautes valeurs sériques de RBP4, l'obésité, la résistance à l'insuline et autres éléments du syndrome métabolique (Gavi et al. 2007, Aeberli et al. 2007, Krzyzanowska et al. 2008). Diverses interventions qui diminuent la RI chez l'humain (ex : le sport), s'accompagnent d'une diminution de la concentration de la RBP4 sérique (Balagopal et al. 2007, Haider et al. 2007, Kovacs et al. 2007, Lim et al. 2008). Néanmoins, tel qu'indiqué dans le chapitre 2, l'alinéa 2.5. de notre revue de littérature, quelques études n'ont pas pu confirmer ces corrélations entre la RI et la RBP4 sérique (Graham T. E. et al. 2007, Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007).

4.2. Raisonnement justificatif

Toutes ces observations suggèrent que la RBP4 est impliquée dans la résistance à l'insuline et le T2DM et qu'elle pourrait être une cible thérapeutique, par le biais d'une réduction de la RBP4 circulante. Il fallait cependant éviter les risques d'une avitaminose A par perte de ROL circulant associée à une diminution artificielle de son transporteur, la RBP4. Notre laboratoire avait observé qu'un traitement à l'AR diminue les niveaux circulants de ROL chez des rats normaux, sans provoquer d'avitaminose A (Bhat Lacroix 1986, 1991b). L'AR étant la forme métaboliquement active de la vitamine A par excellence, aucun risque d'avitaminose A n'était encouru (Bhat and Lacroix 1991a, Keilson et al. 1979). Même si la RBP4 sérique n'a pas été mesurée dans ces études, il est tout à fait possible qu'elle ait été aussi diminuée, parce que le ROL circule principalement lié de façon équimolaire à la RBP4 dans le sang. Si cela était vrai, une diminution subséquente de RBP4 sérique, suite aux traitements avec de l'AR, mais chez des animaux obèses et diabétiques, devrait s'accompagner d'une baisse de la résistance à l'insuline. Depuis le début de notre projet (2008), nous sommes les seuls à avoir étudié ces aspects contextuels chez la souris, particulièrement chez les ob/ob.

De plus, seulement quelques études d'injections d'AR, à des doses assez élevées (ex.100µg/g/pc/j), pour des périodes soit très courtes (4 jours), soit longues (ex : 5 à 20 semaines) et sur d'autres souris obèses et diabétiques que les ob/ob, avaient variablement diminué la masse adipeuse et le poids corporel, suggérant une augmentation de la dépense énergétique et des influences sur la graisse beige/brune (Berry and Noy 2009, Bonet et al. 2000, Puigserver et al. 1996). Il était donc pertinent de vérifier, quels effets une petite dose orale d'AR, pour une courte période de temps et dans un modèle murin (ob/ob) sévèrement obèse et diabétique avec métabolisme de base diminué, aura sur l'appétit, les réflexes, le poids, la morphologie et la plasticité adipocytaires, des indices physiologiques et anatomiques acceptés comme effets valides et probants du métabolisme énergétique.

Il existe une prévalence croissante de l'obésité dans le monde, souvent associée à une hypertension artérielle, à une dyslipidémie et à une dysglycémie, appelées globalement le syndrome métabolique, qui présente un risque élevé pour le développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. La littérature suggère un lien entre le risque plus élevé de ces maladies et le dépôt adipeux abdominal viscéral (Hindle et al.2010).

Des preuves obtenues par nos proches collaborateurs indiquent que des perturbations du métabolisme cardiaque et même des altérations de structure sont liées à une diminution d'expression de gènes liés au système de l'ocytocine (OT) cardiaque (Jankowski et al. 2010a, 2010b). L'AR est un inducteur puissant du système d'ocytocine (OT) dans les cardiomyocytes (Gutkowska et al. 1997), un système qui stimule la synthèse des peptides natriurétiques (ANP et BNP) et de la synthétase endothéliale de l'oxyde nitrique (eNOS), tous impliqués de manière critique dans la cardioprotection (Tamura et al. 2000, Uruno et al. 2005). Pourtant, le potentiel bénéfique de l'AR dans la prévention de l'apoptose pathologique et du remodelage métabolique cardiaque anormal dans l'obésité et le diabète n'avait pas été exploré. Aucune de seulement quinze études de traitement à l'AR chez l'animal compilées à l'orée de 2012 (Bonet et al. 2012) et dont nous avons été validés en pionniers avec nos premiers résultats de ce projet (Manolescu et al 2010), n'avait étudié cet aspect. L'examen des effets cardiaques de l'AR dans un modèle murin (ob/ob) d'obésité et de diabète sévères justifiait de s'y intéresser (Manolescu et al. 2014), étant donné l'existence de preuves cliniques que le risque des maladies cardiovasculaires est augmenté dans de telles pathologies.

4.3. Hypothèses

1) Le métabolisme et l'homéostasie de la vitamine A sont perturbés chez la souris obèse et diabétique ob/ob, avec des concentrations de ROL et de RBP4 sériques élevées. Elles s'accompagnent de concentrations tissulaires élevées de ROL, mais réduites de RBP4. Un traitement à court terme avec une petite dose d'AR mènera à leur normalisation, en association avec une diminution de la résistance à l'insuline, de l'intolérance au glucose et à l'insuline, de la glycémie, de la masse adipeuse et du poids corporel.

2) Ces effets peuvent provenir autant d'une diminution des concentrations de ROL et de RBP4 sériques, que de l'influence de l'AR sur l'expression de gènes du métabolisme de la vitamine A et des indices métaboliques reliés (ex. : une normalisation des taux tissulaires de ROL, des RE et de RBP4), ainsi que sur des indices génomiques – comme l'expression de gènes *PGC1 α* et *UCP1* présents dans la gras beige/brun - et physiologiques du métabolisme énergétique (ex. : l'appétit, les réflexes moteurs ou la morphologie adipocytaire).

3) Étant donné son large spectre d'action, l'acide rétinoïque peut également avoir un effet cardioprotecteur et ainsi prévenir certaines complications – cardiovasculaires notamment – du diabète de type 2. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un traitement à l'AR améliorera aussi l'expression des gènes cardioprotecteurs du système ocytocine-peptides natriurétiques (OT-NP) et du système eNOS, empêchant l'apoptose et l'accumulation de collagène dans les cœurs des souris *ob/ob*, ce qui pourrait diminuer les risques de maladies cardiaques futurs !

4.4. Objectif général

L'objectif général de ce projet de recherche est d'évaluer la capacité de l'acide rétinoïque à abaisser les taux sanguins de RBP4, et à améliorer la résistance à l'insuline et le profil cardiométabolique chez des souris *ob/ob*, un modèle certifié de souris sévèrement obèses, hyperphagiques, sédentaires, résistantes à l'insuline et diabétiques, mais pas carencées en vitamine A. Au Canada il y a abondance alimentaire de rétinoïdes, donc nous n'explorons pas le rôle de carences d'apport alimentaire de vitamine A dans l'obésité bien que, dans les pays en développement, l'apport alimentaire pauvre en vitamine A soit associé à l'obésité et au diabète, en contexte du double fardeau de la malnutrition.

4.5. Objectifs spécifiques

Étant donné qu'une série d'investigations chez les souris et les humains ont montré une relation étroite entre la RBP4 sérique et le diabète induit par l'obésité, nous voulions vérifier si notre traitement à l'AR chez les souris *ob/ob* obèses et diabétique abaissait les taux de ROL et, subséquemment, de la RBP4 sérique, contribuant par cela à améliorer la sensibilité à l'insuline. Les taux de la RBP4 sérique élevés, chez les souris et les humains obèses et résistants à l'insuline, suggèrent que le métabolisme de la vitamine A peut également être perturbé dans ces conditions. Malheureusement, peu ou pas d'informations sont disponibles sur les taux métaboliques circulants et tissulaires de la vitamine A dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète, par exemple pour savoir si le transport de la vitamine A (ROL) est également augmenté suite à l'élévation des concentrations de RBP4 dans le sang durant de telles maladies. Nous avons donc mesuré les taux de ROL et de RBP4 dans le sérum et dans les tissus des souris *ob/ob* pour voir comment le diabète et notre traitement à l'AR affectaient l'homéostasie et le métabolisme de la vitamine A, en parallèle avec la sensibilité à l'insuline et la glycémie de ces animaux. Nous avons également effectué un profil transversal complet d'expressions de gènes

du métabolisme de la vitamine A, en association avec les taux tissulaires de ROL, RE et de RBP4 dans le diabète et après amélioration par traitement à l'AR.

De façon complémentaire, puisque cela n'avait pas encore été fait, nous avons voulu vérifier quels effets notre petite quantité d'AR ($2\mu\text{g/g/pc/j}$) - administrée oralement pour une courte période de temps (9 à 16 jours) dans ce modèle murin obèse-diabétique (ob/ob) peu investigué pour l'AR, hyperphagique, sédentaire et avec métabolisme basal réduit- aura sur l'appétit, les réflexes moteurs, le poids corporel, la morphologie et la plasticité de divers tissus adipeux (sous-cutanés, viscéraux), en tant qu'indices d'impact sur le métabolisme.

Sur un axe de prévention secondaire, les effets potentiels de l'AR dans les changements métaboliques et le remodelage anormal du tissu cardiaque liés à l'obésité et au diabète n'avaient pas été explorés. Par conséquent, dans nos travaux sur la souris ob/ob, nous avons également étudié la capacité de l'AR à améliorer l'expression des gènes cardioprotecteurs du système ocytocine-peptides natriurétiques (OT-NP) et du système eNOS, systèmes associés à la survie cellulaire et à la prévention de l'apoptose pathologique, du remodelage cardiaque défavorable et de l'accumulation de collagène dans les cardiomyocytes de ces souris obèses et diabétiques (Manolescu et al 2014). L'examen des effets de l'AR sur le cœur de ce modèle animal d'obésité sévère se justifie, en raison du risque bien établi et augmenté de développer une maladie cardiovasculaire chez les patients souffrant d'obésité et de diabète, mais aussi parce que nos premières expériences sur ce projet ont clairement démontré que notre traitement à l'AR diminuait la résistance à l'insuline, la glycémie et le poids corporel chez les souris ob/ob (Manolescu et al 2010).

4.6. Présentation comparée, systémique et intégrée de variables

1) Physiologie

Nous avons mesuré le poids corporel, l'appétit via l'apport alimentaire journalier d'énergie, les réflexes moteurs, les concentrations sériques et tissulaires de la protéine RBP4 et de la vitamine A, la glycémie et la tolérance au glucose (IPGTT) et à l'insuline (IPITT).

2) Histologie

Il est souvent intéressant d'étudier un phénotype intermédiaire (ex. tissulaire), pour renforcer une première association trouvée entre des données biomoléculaires (ex. variations d'expressions géniques) et des données physiologiques. Dans le cas présent nous avons étudié

les dimensions et les morphologies des adipocytes dans les tissus adipeux sous-cutané et viscéral, et observé d'autres signes de plasticité adipocytaire (ex : adipogenèse beige, présence d'acides gras PUFA et possiblement angiogenèse et autophagie). Nous avons étudié la morphologie des cardiomyocytes à la recherche de signes d'apoptose et de fibrose.

3) Biomoléculaire

Puisque la concentration sérique du transporteur de ROL, la RBP4, est élevée en condition d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète, il est possible que le métabolisme des rétinoïdes soit perturbé à une plus grande échelle, y compris la production endogène d'AR. Si c'est le cas, cela pourrait affecter l'activation des récepteurs nucléaires d'AR, les RAR et RXR, et influencer des gènes dépendants. Aussi un traitement à l'acide rétinoïque pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline non seulement par une diminution de la RBP4 sérique, mais également par des effets sur des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A ou encore celui de l'énergie. Nous avons donc examiné l'impact de l'AR sur l'expression (mRNA) des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A et sur deux gènes spécifiques (PGC1 α et UCP1) impliqués dans le métabolisme de l'énergie, la genèse mitochondriale et la plasticité adipocytaire (gras beige/brun). Nous avons également examiné l'impact de l'AR sur l'expression (mRNA) des gènes des RAR et RXR. Puisque le métabolisme de la vitamine A est peu étudié en condition de résistance à l'insuline et de diabète, nous avons également mesuré les concentrations sériques et tissulaires de la RBP4 et de la vitamine A. Toutes ces investigations ont été faites sur le gras sous-cutané (SF), le gras viscéral (VF), les muscles squelettiques (SM) et le foie (LIV) des souris *ob/ob*. Dans le cœur (HT) de ces souris, nous avons investigué l'expression (mRNA) de plusieurs gènes pro-et anti-apoptotiques et des gènes des systèmes ocytocine-peptides natriurétiques et eNOS, réputés pour leurs capacités cardioprotectrices.

4.7. Méthodologie

1) Sujets de l'étude : les souris *ob/ob*, un excellent modèle obèse et diabétique

- Les souris *ob/ob* sont génétiquement modifiées pour être dépourvues de leptine (-/-), leur mécanisme de la satiété est perturbé (hyperphagie) et mène à l'obésité. Le manque de leptine contribue à diminuer leur métabolisme et leurs hormones sexuelles (Chehab FF et al.1996).

- Elles sont caractérisées par l'obésité extrême, l'hyperinsulinémie, la résistance sévère à l'insuline, l'hyperglycémie, le dysfonctionnement partiel des cellules β , l'intolérance à l'insuline et au glucose, et les autres anomalies cardiométaboliques qui ressemblent au phénotype clinique du diabète humain de type 2 (Zhang Y. et al. 1994).
- En revanche, les souris ob/ob ne sont pas génétiquement modifiées pour des gènes du métabolisme de la vitamine A, ni soumises à des carences d'apport alimentaire de vitamine A.
- Elles sont sédentaires, léthargiques et ont des réflexes réduits. Elles ont le métabolisme de base et la température corporelle réduits, validés par cages métaboliques (Jackson Lab USA).
- Elles présentent aussi des taux d'hormones sexuelles insignifiants, ce qui les rend infertiles (Swerdloff RS et al. 1976). Cette stérilité contribue à diminuer leur métabolisme général.
- À l'âge de 9-10 semaines, les souris ob/ob sont obèses et développent déjà une forte résistance à l'insuline, une hyperinsulinémie avec décompensation, de l'intolérance au glucose et de l'hyperglycémie (Genuth SM, Rosenberg DM 1971).
- Des anomalies cardiaques sont également observées dans ce modèle de souris à l'âge de 9 - 10 semaines déjà, et bien que l'hypertrophie cardiaque soit absente, l'apoptose cardiaque et la fibrose se développent et progressent avec l'âge (Barouch et al. 2006).
- Usage préférentiel de femelles ob/ob, car nous voulions :
 - Diminuer les biais et dépenses énergétiques éthologiques spécifiques aux animaux grégaires (ex.: compétition pour dominance, mâle alpha, compétition pour femelles, nourriture, eau) ;
 - Diminuer leur potentiel de dépenses cinétiques (car moins de muscles que les mâles) ;
 - Avoir également un métabolisme de base le plus bas possible (car moins de muscles) ;
 - Éviter ainsi les hormones masculines, connues pour stimuler le métabolisme général;
 - Avoir même moins d'hormones sexuelles féminines, si possible. En effet, les femelles ob/ob ont des taux d'œstrogènes insignifiants, ce qui les rend infertiles et contribue à maintenir leur métabolisme général très bas (Swerdloff RSet al. 1976) ;
 - Ces phénotypes de masse musculaire et niveaux d'œstrogènes réduits, accompagnés d'obésité et de résistance à l'insuline, parce qu'ils ressemblent aux phénotypes humains après la ménopause pour les femmes, et souvent chez les deux sexes pour les personnes âgées, quand l'incidence du diabète de type 2 et de troubles métaboliques associés augmente.

- Que leur absence de leptine permet un mimetisme (extrême) des diminutions fonctionnelles de la leptine chez les femmes obèses-diabétiques, (Buyukbese MA et al. 2004). Une baisse d'impact de la leptine diminue le métabolisme général, alors que l'appétit reste augmenté.
- Que nos souris soient obèses et diabétiques dès leur plus jeune âge, avec plus des risques de complications cardiométaboliques associées, tout en maintenant - voire aggravant - ces phénotypes avec le temps. Cela ressemble à la dynamique clinique humaine en la matière.
- Les souris ob/ob permettent d'éviter les interférences conjuguées d'un traitement à l'AR, avec la leptine et les hormones sexuelles endogènes, sur le métabolisme énergétique global (Chehab FF et al. 1996, Rouru et al. 1999). Cependant, ce n'est pas l'objectif principal. Ce qui compte d'abord est de voir si l'AR peut baisser la RI via une baisse de la RBP4 sanguine. Puisque cela arrive sans leptine, cela suggère des mécanismes d'actions indépendantes d'elle.
- Au début de notre projet (2008), les souris ob/ob étaient peu étudiées pour l'impact de l'AR sur leur métabolisme et pas du tout pour son potentiel à diminuer la RI - via une diminution de la RBP4 et du ROL circulants et tissulaires - ou à prévenir la plasticité cardiaque anormale (Manolescu et al. 2014). Ainsi nous avons été validés parmi les pionniers (Bonnet et al. 2012) avec nos premiers résultats (Manolescu et al 2010). Depuis le début de notre projet en 2008 à ce jour, nous sommes les seuls à avoir étudié ces aspects contextuels.

En conclusion -Les souris ob/ob femelles sont un modèle d'obésité, de résistance à l'insuline, de diabète et de métabolisme de base diminué, conditions que l'on retrouve dans l'obésité et le diabète humain de type 2 avec les anomalies cliniques et les risques métaboliques cardiaques spécifiques. Par extrapolation aux humains pour l'âge, le poids et les traits cliniques diabétiques, nos souris ob/ob représentent pour la gent « murine » ce que des jeunes adultes de **20 ans**, de taille moyenne (**1,65 m**), pesant plus de 195 kg (**430 lb**), hyperphagiques, très sédentaires depuis l'enfance, avec système musculaire atrophié, diabétiques mal contrôlés et avec baisses endocriniennes spécifiques (hormones sexuelles et sensibilité à la leptine entre autres) sont pour la « gent » humaine. C'est un scénario d'obésité-diabète extrême, qui malheureusement est devenu une réalité courante ! Nous pouvons le voir à l'émission de télévision « *La Vie à 600 lb* » ! Selon l'optimisation des systèmes, les modèles extrêmes permettent de saisir plus vite (par contraste) les éventuelles améliorations (même petites) après une intervention, auquel cas tout modèle cliniquement moins grave a d'autant plus d'espoir de connaître une amélioration.

Bonus: Nous avons tous entendu parler du paradoxe **MHO** « *metabolically healthy obes* » pas encore bien compris chez les humains. D'autre part, les mammifères hibernants sont, à notre humble avis, un excellent modèle d'étude du métabolisme énergétique, de l'hyperphagie et de l'obésité. Ils augmentent leur appétit par diminution de la leptine durant l'été, jusqu'en début de l'automne quand ils atteignent un maximum d'obésité. Mais ils restent vraiment « *metabolically healthy* » sans RI ni diabète ! Ce sont aussi les animaux ayant le plus de vitamine A (RE) dans leur foie. Elle sera utilisée sous forme d'AR, sa forme la plus bioactive. Pour leur part les souris ob/ob sont un modèle de mammifères extrêmement « bas » en leptine (car *lep* -/-), développant de l'hyperphagie et de l'obésité. Mais ils développent aussi de la RI et du diabète, eux ! De plus, on se rappelle que les réserves biologiques de vitamine A (par mg de foie) des rongeurs sont naturellement inférieures à celles des mammifères hibernants.

Observation : Lorsque nous avons traitées nos souris ob/ob à l'AR (forme active de la vitamine A), la RI, leur intolérance à l'insuline et au glucose et leur glycémie ont diminué ! Donc la vitamine A (sous forme d'AR) semble aider à être « métaboliquement bien ». Bien sûr nous ne pouvons pas mettre un « *n* » statistiquement suffisant d'ours en « grottes métaboliques » pour explorer les mécanismes, ni les étudier en profondeur. Peut-être alors que les souris ob/ob, seul modèle obèse et diabétique via une déficience en leptine, pourront révéler, par l'intermédiaire de l'AR et du métabolisme des rétinoïdes, divers mécanismes pour améliorer le profil cardiométabolique et garder des obèses « métaboliquement bien » le plus longtemps !

2) Procédures expérimentales

Seize souris B6. V-Lep/J *ob/ob*, obèses et RI, âgées de 9 semaines, ont été divisées en deux groupes. Un premier groupe (n=8) fut traité avec 100 µg d'*at*-AR/jour (2µg/gram poids corporel/jour) dans 100 µl d'huile de maïs (véhicule) et un deuxième groupe (n=8) seulement avec le véhicule, par intubation gastrique, durant 16 jours. Toute carence alimentaire (y compris de la vitamine A) est exclue car tous les animaux sont nourris *ad libitum*, avec la très connue diète internationale équilibrée Harland Tekland, spécialement formulée et standardisée pour les animaux de laboratoire. Après 16 jours les animaux ont été sacrifiés. Durant ce temps et *post mortem* des observations, investigations et mesures spécifiques ont été pratiquées selon des protocoles reconnus, validés et couramment utilisés dans la littérature. Nous n'avons donc pas à prouver de nouveau leur validité ici. Des souris de poids normal et en santé (n=5-9) ont servi

de témoins sains, quand nécessaire. Le sang et les tissus ont été surgelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'aux diverses analyses et protocoles d'investigation utilisés.

3) Protocole d'investigation en bref

1. Variation journalière du poids corporel (pesée sur la balance de précision)
2. Observation des réflexes moteurs et de l'activité spontanée par éléments validés du protocole SHIRPA : posture et locomotion spontanée 3 fois/24 h, réactivité au toucher et réflexe de suspension caudale 1 fois/24 h, le matin avec le traitement pour ne pas les stresser.
3. Quantité de nourriture consommée sur 24 heures (en grammes, pesée sur la balance de précision) avec l'apport énergétique certifié par Harland T. de 13,7 kJ/gramme de nourriture.
4. Concentrations du glucose sanguin aux jours 9 et 16 (par glucomètre AcuCheck/Roche).
5. Test de tolérance au glucose (IPGTT) et à l'insuline (IPITT) aux jours 15 et 16 (par glucomètre AcuCheck/Roche, avec le protocole validé des plages temporelles habituel).
6. Taux sériques et tissulaires de RBP4 et de vitamine A le jour 16 (Western Blot, HPLC).
7. Extraction ARN du gras sous-cutané (SF) et viscéral (VF), des muscles (SM), du foie (LIV) et du cœur (HT) par le procédé Trizole, vérification, amplification et obtention de l'ADNc.
8. Expression des gènes (mRNA) des métabolismes de la vitamine A, énergétique et cardiaque (par méthode RTqPC comparative $\Delta\Delta C_t$ valide et contrevalidée par deux labos indépendants, avec no. de cycles C_t valide et stabilité de gènes de contrôle interne pour tous les animaux).
9. Histologie des gras sous-cutanés et viscéraux et du tissu cardiaque (par montages sur lamelles, colorations par hématoxyline éosine et microscopie de précision)
10. Cryo-séparation à -20°C de phases d'agrégation des solutions d'acides gras du SF et VF.

***Note 1:** Les rubriques « Matériel et méthodes » de nos articles et publications, qui suivent dans cette thèse, détaillent toutes ces procédures d'investigation. Pour éviter la redondance, nous n'avons pas remis une deuxième fois *in extenso* toutes ces informations ici.

*** Note 2:** Pour des raisons évidentes de rigueur scientifique, nous avons utilisé seulement des protocoles, méthodes et techniques d'investigation, de mesure et de calcul qui ont déjà été validés maintes fois dans la littérature, depuis des décennies maintenant. Plusieurs sont effectués en sous-traitance dans des laboratoires scientifiques hospitaliers dûment certifiés. Nous n'avons donc pas à justifier ou prouver de nouveau leur validité ou leur bien-fondé. Évidemment nous citons lesdits agréments, validations et certifications, lorsque nécessaire. Il n'est pas nécessaire non-plus de redémontrer des acquis scientifiques de base (ex.: la chaleur spécifique de 9Kcal/g pour tout gras sur la Terre, les points de fusion spécifiques des acides gras ou l'impossibilité de maîtriser les réflexes nerveux innés par le SNC des mammifères).

CHAPITRE 5: Article 1; publié *Journal of Nutrition* ASN 2010

All-trans Retinoic Acid Lowers Serum RBP4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice

Daniel-Constantin Manolescu, Aurelia Sima and Pangala V. Bhat

The Journal of Nutrition, 140: 311-316; 03.2010

Contributions des auteurs

Daniel-Constantin Manolescu a contribué de façon déterminante à l'élaboration du projet de recherche à tous les niveaux, soit : la définition des hypothèses et des objectifs, les revues de littérature, le choix des protocoles et la mise au point des techniques, le management administratif, la réalisation des expérimentations, l'analyse, l'interprétation et la présentation des résultats, la rédaction du manuscrit, la soumission pour publication et les réponses aux réviseurs. Par son esprit d'initiative, son efficacité et son autonomie il a beaucoup enrichi le projet et a largement contribué à augmenter sa productivité en résultats et perspectives.

Le présent projet de recherche s'inscrit en continuité de l'expertise de plus de 35 ans en analyse HPLC et métabolisme des rétinoïdes du directeur du projet, Dr P.V. Bhat. Il a donc vérifié les techniques et la qualité des expérimentations et contribué à leur design, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit, prenant les décisions dues comme directeur.

M.Sc. ing. Aurélia Sima a contribué par l'analyse mathématique des résultats, les calculs statistiques et les présentations graphiques sous forme de figures et tableaux.

Le directeur, Dr Pangala V Bhat a dirigé et supervisé toutes les étapes du projet et à confirmé, par lettre officielle (Annexes), les contributions détaillées des coauteurs à ce projet, dont la contribution majoritaire du premier auteur Daniel-Constantin Manolescu.

**All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations
and increases insulin sensitivity in diabetic mice**

Daniel-Constantin Manolescu, Aurelia Sima and Pangala V. Bhat*

Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôtel-Dieu and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, H2W 1T7, Québec, Canada

*To whom correspondence should be addressed: E-mail: Pangala.V.Bhat@umontreal.ca.

Abbreviations used: AUC, area under the curve; IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test; IPITT, intraperitoneal insulin tolerance test; RA, retinoic acid; RA⁻, control diabetic group (ob/ob mice not treated with RA); RA⁺, ob/ob mice treated with RA group; RBP4, retinol binding protein 4; ROL, retinol; RAR, retinoic acid receptor; TTR, transthyretin.

Key words: obesity, insulin resistance, diabetes, RBP4, retinoic acid, retinol, HPLC.

The Journal of Nutrition, 140: 311-316; 03.2010

Abstract

Recent investigations have demonstrated that elevated serum retinol-binding protein 4 (RBP4) secreted from adipose tissue plays a role in the development of systemic insulin resistance, and lowering RBP4 improves insulin sensitivity. These observations provide a rationale for the development of new antidiabetic agents aimed at reducing serum RBP4 concentration. In this study, we sought to determine whether retinoic acid (RA) administration decreases serum RBP4 and suppresses insulin resistance in diabetic *ob/ob* mice. All-*trans* RA (100 µg/mouse/day in corn oil) was administered by stomach intubation to a group of *ob/ob* mice, with the control group receiving the vehicle for 16 days (d). Body weight and food intake were monitored. Glucose and insulin tolerance tests were performed. We quantified serum RBP4 and retinol by Western Blotting and HPLC, respectively. RA treatment reduced body weight ($P < 0.05$), basal serum glucose ($P < 0.001$), serum retinol ($P < 0.01$) and RBP4 ($P < 0.05$). It improved insulin sensitivity and decreased the retinol: RBP4 ratio ($P < 0.05$). These studies suggest that RA is an effective anti-diabetic agent that could be considered in the treatment of type 2 diabetes. J. Nutr. 140: 311-316; 03.2010.

Introduction

All-*trans* retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A, is essential for embryogenesis and the proper maintenance of epithelial structure (1,2). Many biological functions of RA are mediated by RA receptors (RARs and RXRs) (3). RA is also a powerful chemopreventive agent (4). Clinical investigations have demonstrated that it elicits complete remission in patients with acute promyelocytic leukemia (4,5). RA is also currently administered for the treatment of prostate cancer or neuroblastoma, and various other RA forms (retinoids) represent chemopreventive approaches in patients with premalignant lesions, such as actinic keratinosis, leukoplakia and cervical dysplasia, or after therapy of primary skin, oral, lung and breast cancers (6,7). Although RA is a promising anticancer drug, its efficacy against other diseases, such as diabetes, has not been explored.

Retinol-binding protein 4 (RBP4), a 21-kDa protein, is a physiological carrier of retinol in the circulation (8). The liver is the major site where RBP4 is synthesized and retinol is mobilized from hepatic vitamin A storage depots bound to newly-synthesized RBP4 in a 1:1 molar ratio (9, 10). In the circulation, RBP4 exists as a protein complex with the higher molecular weight protein transthyretin (TTR), which prevents glomerular filtration and reduces renal clearance (11). In addition to the liver, other organs and tissues also express RBP4 (12). Recent investigations have demonstrated that serum RBP4 is increased in insulin-resistant mice and agents that lower RBP4 improve insulin sensitivity (13). Serum RBP4 concentrations correlate with the magnitude of insulin resistance in participants with obesity, impaired glucose tolerance, or type 2 diabetes, and in nondiabetic participants with a strong family history of type 2 diabetes (14). In addition, elevated serum RBP4 is associated with metabolic syndrome components, such as increased body mass index (BMI), waist-to-hip ratio, serum triglyceride

concentrations and systolic blood pressure. Interestingly, exercise training is accompanied by a reduction in serum RBP4 concentrations only in participants with improved insulin resistance. Recently, extensive trials in insulin-resistant adults and children from multiple ethnic backgrounds discerned strong links between serum RBP4 concentrations and insulin resistance and secretion, obesity, and metabolic syndrome components (15-18). In addition, interventions that ameliorate insulin resistance in humans lower serum RBP4 (19-21). Genetic modifications in RBP4 are also associated with heightened risk of type 2 diabetes (22, 23). All these findings provide a rationale for antidiabetic therapies aimed at reducing serum RBP4 concentrations. However, a few studies have not found a correlation between insulin resistance and serum RBP4 (24-27), which has been attributed to methodological problems (28).

We and others have shown that dietary RA dramatically depresses circulating retinol levels in rodents (29-31). Although RBP4 was not measured in these studies, its levels might have been diminished, because retinol was bound to RBP4 in serum. Because RA has retinol-RBP4-lowering effects, we hypothesized that the treatment of diabetic mice with RA may result in the suppression of insulin resistance.

Materials and Methods

Mice. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Montreal Research Centre. Sixteen female 9-wk-old B6.V-Lep/J *ob/ob* mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). They were divided into 2 groups of 8 mice each: 1 control (RA⁻) and 1 RA-supplemented (RA⁺). The mice were housed (4 per cage) under environmentally controlled conditions and a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard rodent pellet diet (no. 2018, 18% protein for rodents, Harlan Teklad (Madison, Wisconsin, USA). The composition of the diet was (g/kg): crude protein, 188; crude oil 60 (total saturated, 9.6; total monounsaturated, 12.8; and total polyunsaturated, 34.1), crude fiber, 38; carbohydrates, 500 (starch, 450; and sugar, 50), mineral mix, 32.05; vitamin mix, 2.9; and energy, 13.7 kJ/g. They were acclimatized to their new environment for 1 wk before the experiment started. Body weight and food intake were measured daily. Ten-week-old lean mice (C57BL/6 strain), obtained from Charles River Labs (St-Constant, Quebec, Canada) and fed standard rodent pellet diet, were studied to determine the normal levels of RBP4, retinol and their ratios.

RA preparation and administration. All-*trans* RA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in corn oil and delivered at a dose of 100 µg in 100 µL to the mice by stomach intubation daily in the morning. RA⁻ mice received only the vehicle, corn oil. RA supplementation continued for 16 d. Because RA is a relatively unstable compound, the solution was prepared daily and stability was verified by high pressure liquid chromatography (HPLC). To avoid possible RA breakdown from light exposure, all operations with RA were undertaken in dim light.

Measurement of blood glucose, intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests; Mice were deprived of food for 4 h and blood glucose concentrations were measured in tail blood samples on d 9 (during treatment) and d 16 (last day of treatment) when intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (IPGTT and IPITT) were performed. For IPGTT and IPITT, the mice received injections of glucose (1 g/kg body weight) and human regular insulin (1 IU/kg body weight), respectively. Blood glucose levels were quantified by Accu-Check glucometer (Roche, New Mannheim, Germany) from tail blood samples at 0, 20, 40, 60, 90 and 120 min after glucose and insulin administration.

Collection and storage of serum samples. After mice were deprived of feed overnight, blood was collected into vacutainer tubes containing a silica gel-based clotting activator and previously wrapped with aluminum foil to minimize light exposure. The samples were immediately processed in a dark room, and serum was obtained by centrifugation at 8165 x g at 4°C (Eppendorf Centrifuge, model 5415C), then stored in 1.5 mL brown Eppendorf cryotubes at -80°C until analysis. They were thawed once and simultaneously assayed for retinol and RBP4.

Extraction of retinol from serum samples for HPLC. Retinol from the serum samples was extracted by butanol/acetonitrile (equal volumes) essentially as described by McClean et al. (32) except that the method was applied to smaller sample volumes. Samples stored at -80°C were defrosted on ice and centrifuged for 10 min at 4°C at 735 x g (Eppendorf Centrifuge, Model 5415C) to obtain clear supernatants. Then 200 µL of serum was transferred to a borosilicate tube wrapped in aluminium foil and 200 µL of butanol/acetonitrile (1:1) was added. The mixture was vortexed for 1 min and, after the addition of 72 mg hydrated K₂PO₄ in 20 µL of water, was vortexed again for 30 s. The extraction mixture was centrifuged at 2620 x g for 15 min in a

Sorval RC3C Plus centrifuge precooled to 4°C. A total of 100 µL of clear supernatant was injected into the HPLC system. Recovery studies were performed with the addition of retinoids (5-50 ng/100 µL range) to 3 separate serum samples. Retinol recovery in this extraction method is > 99%. **HPLC of serum retinol.** The HPLC system consisted of Shimadzu Model LC-10ADVP equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system (Man-Tech, Guelph, Ontario). Retinol was separated on a Partisil 10-ODS analytical column (250 X 4.5 mm, Grace Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA) and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water 65:35), containing 10 m mol/L ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 mL/min. Retinol was detected by a photodiode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) that collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for retinol were obtained with standard pure solutions of retinol (Sigma-Aldrich). Characteristic UV spectra and retention times were identified for retinol and peak areas were measured at $\lambda_{\text{max-330}}$ in a Shimadzu Model SZ-228 data system. The detection limit for retinol was 2 pg.

Measurement of serum RBP4 by quantitative Western blotting. Serum RBP4 was quantified essentially as described by Graham et al. (28). Pure human urinary RBP4 (Sigma-Aldrich) served as standard protein for RBP4 quantification. Standard solutions of 20, 40 and 80 ng/µL of RBP4 and 1-µL serum samples were used in the analysis. Proteins were separated on 15% Tris-glycine SDS-PAGE gels, and were transferred to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham, Boston, MA USA). The blots were incubated overnight at 4°C with primary antibody, anti-RBP4 raised against full-length human RBP4 that is recommended for the detection of precursor and mature mouse, rat and human RBP4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The primary antibody was diluted 1:700. The blots were subsequently incubated for 1 h at room temperature with horseradish-peroxidase-conjugated secondary

antibody (goat anti-rabbit IgG-horsedishperoxidase, diluted 1:3,000, Santa Cruz Biotechnology). Antibody complexes were visualized by enzymatic chemiluminescence (chemosubstrate kit from Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), and the bands were quantified with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA). Standard RBP4 calibration curves (second-order polynomial curves $r^2 > 0.99$) for each individual gel were charted to calculate its concentrations in serum.

Statistical analysis. The results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls analysis (Prism Graph Pad software). An unpaired Student's t test was used for comparison of area under the curve (AUC)-glucose and AUC-insulin. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

RA supplementation reduces body weight. Mice began to lose weight 2 days after RA administration (**Fig.1**) and continued to do so for 13 d, after which they gradually started to gain weight at a low rate. On the other hand, mice in the RA⁻ group grew normally and gained weight during the course of the experiment. Body weights of the RA⁺ mice were less than those of the RA⁻ mice, beginning on d 4 of the study ($P < 0.05$) (**Fig.1**) On d 16, RA⁺ mice weighed 7,4% less than RA⁻ controls ($P < 0.01$). The lower weight was not due to reduced food intake, which did not differ between RA⁻ (5.43 ± 0.14 g/mouse/d) and RA⁺ (5.17 ± 0.13 g/mouse/d) groups.

RA supplementation lowers basal blood glucose concentrations, improves glucose tolerance and suppresses insulin resistance. Blood glucose concentrations after 4-h food removal in *ob/ob* mice were measured on days 9 and 16 after daily administration of RA or vehicle. RA

treatment decreased basal blood glucose ($P < 0.001$) on days 9 and 16 (**Fig.2**). The blood glucose-lowering effect of RA was dramatic, with concentrations in the RA⁺ group being ~45% less than in RA⁻ mice at both times. Glucose tolerance was evaluated in RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice by IPGTT, and significant improvement was observed in the RA⁺ group (**Fig. 3A**). The difference in the area under the curve (AUC) of blood glucose between RA⁻ and RA⁺ mice was 20% ($P < 0.01$). To assess the amelioration of insulin sensitivity by RA, we performed IPITT and measured glucose excursion in response to insulin. RA treatment resulted in decreased blood glucose concentrations at 20-60 min (**Fig.3B**), indicating significant suppression of insulin resistance. The difference in the AUC of blood glucose between RA⁻ and RA⁺ mice was 34% ($P < 0.05$).

RA treatment lowers circulating retinol and RBP4 concentrations and ROL: RBP4 ratio.

It has been demonstrated that RA supplements in the diet lower serum retinol concentrations in rats. Therefore, it was of interest to determine whether RA treatment alters serum retinol and RBP4 concentrations in *ob/ob* mice. Supplemental Figure 1 illustrates HPLC separation of retinol extracted from the serum of RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice and lean controls. RA⁺ *ob/ob* mice had a 29% lower serum retinol concentration than RA⁻ mice (4.2 ± 0.40 vs 5.9 ± 0.34 $\mu\text{mol/L}$ respectively; $P < 0.01$). However, RA treatment for 16 days did not normalize the serum retinol concentrations of *ob/ob* mice; it was lower in lean mice ($1.9 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$) than in both *ob/ob* groups ($P < 0.001$). Serum RBP4 concentrations were analyzed by quantitative Western blotting. **Figure 4A** depicts representative Western blots of RBP4 from RA⁻, RA⁺ *ob/ob* and lean mice along with standard pure RBP4. RA treatment reduced serum RBP4 concentrations in *ob/ob* mice (13%; $P < 0.05$) (**Fig.4B**), in good agreement with improved insulin sensitivity (**Fig.3**). Although RA significantly decreased serum RBP4 concentrations, the still differed from

those of lean mice (**Fig.4B, c**). The *ob/ob* mice had a serum retinol:RBP4 ratio of 2.4 ± 0.14 ($P < 0.01$) (**Fig.4C, a**), higher than that of lean mice (1.38 ± 0.07 ; $P < 0.01$) (**Fig. 4C, c**). RA treatment reduced the retinol: RBP4 ratio in *ob/ob* mice (1.97 ± 0.12) (13%; $P < 0.05$), but did not normalized it to that of lean mice. However, decreased basal blood glucose and suppression of insulin resistance as a result of RA treatment are consistent with the reduction of the retinol:RBP4 ratio.

Discussion

In this study, we investigated the effects of RA on glucose homeostasis in a type 2 diabetic *ob/ob* mouse model. In addition, we examined the relationship between insulin sensitivity and retinol-RBP4 levels. Obesity in this insulin-resistant mouse model is due to a mutation in the obesity gene that codes for leptin. These mice exhibit profound obesity, insulin resistance and metabolic abnormalities such as hyperglycemia, hyperinsulinemia and glucose intolerance, which phenotypically resemble human type 2 diabetes (33). These mice also exhibit reduced metabolism and body temperature. We used 9-10-wk-old *ob/ob* mice, because at this age, they have well-developed insulin-resistance and hyperinsulinemia (34). Our results clearly demonstrated that RA significantly improved glucose homeostasis. Basal glucose levels were significantly lower at day 9 and were not altered until the end of treatment (16 days), indicating maintenance of lower glucose levels with long-term administration rather than an acute hypoglycaemic effect after a single dose. In addition, RA treatment significantly ameliorated glucose and insulin tolerance.

Several authors have reported that vitamin A is involved in the regulation of adiposity and energy balance (35,36). Mice receiving vitamin A lost weight (37) and it was recently observed that obese mice generated by a high-fat diet lost weight when they consumed a RA

diet for 5 wk (38). Although RA suppressed insulin resistance in this study, it did not lower basal glucose levels. We administered RA orally to diabetic mice for 16 days, and they lost 10% of their weight. Because the food intake of RA-treated mice did not differ from that of untreated controls, the weight loss of these mice reflected an improvement in energy expenditure.

We have previously demonstrated that RA in the diet dramatically lowers circulating retinol levels, probably due to a feedback signal generated by peripheral tissues (30, 31). A recent experiment disclosed decreased adipose-RBP4 production in mice administered RA subcutaneously for 4 days (39), suggesting that the lower RBP4 levels seen in RA⁺ mice in the current study could be the result of diminished synthesis and secretion of adipose-derived RBP4. Because a series of investigations in mice and humans have shown a strong relationship between serum RBP4 and obesity-induced diabetes, we wanted to test whether RA treatment in diabetic mice lowers serum RBP4 and improves insulin sensitivity. Our experiments on *ob/ob* mice revealed a serum RBP4-lowering effect of RA and a concomitant increase in insulin sensitivity. It is likely that the overall effects of RA in enhancing glucose homeostasis are due not only to decreased serum RBP4, but also to the activation of insulin-sensitizing genes through RARs, RXRs and peroxisome proliferation-activated receptors (PPARs) (40, 41). This view is supported by a recent report that RA represses obesity and insulin resistance by activating PPAR β/δ and RARs (38). Another study found that lowering only serum RBP4 was not sufficient to improve insulin sensitivity in obese mice (39). In this investigation synthesized non-retinoid A1120 - a small molecule that binds with high affinity to RBP4 - displaced TTR from RBP4-TTR complexes and decreased serum RBP4, but was unable to enhance insulin sensitivity. It is noteworthy that a retinoid analog, fenretinide, also lowered serum RBP4 by a mechanism similar to non-retinoid A1120 but improved insulin sensitivity, indicating the

involvement of alternative mechanisms (13,42). These studies and our experiments suggest that a retinoid moiety that decreases serum RBP4, appears to be important in regulating glucose homeostasis in diabetic conditions. The observation of serum RBP4 elevation in obese and insulin-resistant mice and humans indicates that vitamin A metabolism may be altered under these conditions. However, limited information is available on the rate of vitamin A metabolism in diseases such as diabetes, where vitamin A transport is enhanced by serum RBP4 elevation. It is possible that, in addition to other factors, lowering serum RBP4 may be important for the suppression of insulin resistance.

In the fasted state, retinol bound to RBP4 circulates in the blood in approximately a 1:1 molar ratio, and studies have shown that a small quantity of retinol unbound to RBP4 is also present in the circulation (43,44). Although, theoretically, the retinol/RBP4 ratio in blood is 1, the measured ratio is > 1 due to the presence of free retinol in the circulation. Motani et al. (42) reported a serum retinol/RBP4 ratio of ~ 1.78 in lean mice which was slightly higher than our values in such animals (1.38, **Fig. 4**). Several authors have discerned an association between the serum retinol/RBP4 ratio with obesity and type 2 diabetes (16, 45, 46), suggesting that the serum retinol/RBP4 ratio is a more relevant indicator of type 2 diabetes than serum RBP4 alone. In our studies, we found a significant increase in the serum retinol: RBP4 ratio in *ob/ob* mice compared with lean mice, and treatment with RA lowered the ratio by 20%. Because the decreased serum retinol: RBP4 ratio is consistent with the improvement in glucose homeostasis, we propose that it could be used to test the efficacy of drugs that improve the glycemic index. However, more work in several insulin-resistant animal models is needed to strengthen this hypothesis. Interestingly, a significant amount of unbound retinol (based on the retinol-RBP4 ratio), a potential toxin, is present in the circulation of *ob/ob* mice. It is not clear whether excess free

retinol in serum contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes. In this context, recent studies have reported a greater retinol: RBP4 ratio in cerebrospinal fluid (CSF) than in the serum of participants with idiopathic intracranial hypertension (IIH), indicating the involvement of free retinol in CSF in the pathogenesis of IIH (47, 48).

In summary, the present work demonstrates that RA treatment significantly improves insulin sensitivity and glucose homeostasis in insulin-resistant *ob/ob* mice. Our results support the antidiabetic activity of RA that could prove to be of clinical importance and provide new treatment strategies in the management of type 2 diabetes. In addition, the serum retinol-RBP4 ratio may provide the therapeutic potential of drugs in treating type 2 diabetes.

Acknowledgements

P.V. Bhat designed research and wrote paper (*fixed the final version*). D. Manolescu and A. Sima conducted research. All authors read and approved the final version of the paper.

Authorship statements

*« Daniel Manolescu contributed to this work interactively on multiple levels beyond conducting the experiments. This included, research design, administrative management, literature review, interpretation and presentation of results, contribution to manuscript writing and responses to reviewers. The **Acknowledgement** in this paper means the work was performed under my supervision, and reflects the fact that, after team consultation, I took as the lab director the major design and manuscript decisions, as is common when training a graduate student. This does not detract in any way from Daniel's assiduous work in the lab and animal facility since already 2008, his initiative, critical thinking and intellectual contribution to the quality of the study. I have indeed acknowledged Daniel's important contributions by assigning him the legitimate right to include this paper in his PhD thesis as a published article. In conclusion I hope that this letter will lift any doubt and I am highly supportive of his candidacy for the grade of PhD Nutrition /Medicine »*

18.03.2017 **Pangala V.Bhat** PhD- Professor, Department of Nutrition

Conflict of interests: P.V.Bhat, D.C. Manolescu, A. Sima, have no conflict of interests.

Support: Supported by a grant from Canadian Institute of Health Research, to Dr. P. V. Bhat.

Literature Cited

1. Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM: Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 2000; 80:1021-1054.
2. Rosenthal DF, Lancillotti F, Darwiche N, Sinha R, De Luca LM: Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In *Regulation of Epithelial Differentiation by Retinoids*. R. Blomhoff, Editor. M. Decker, New York, 1994; 425-450.
3. Chambon P: A decade molecular biology of RA receptors. *FASEB J* 1995; 10:940-954
4. Warrell RP, Frankel SR, Miller WH, Scheinberg DA, Itri LM, Hittleman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A: Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans retinoic acid). *N Engl J Med* 1991; 324:1385-1393.
5. Haferlach T, Löffler H, Glass B, Gassmann W: Repeated complete remission in a patient with acute promyelocytic leukemia after treatment with 13-cis retinoic acid first and with all-trans retinoic acid in relapse. *Clin Investig* 1993; 71:774-779.
6. Petkovich PM: Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:S136-S142.
7. Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E: Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003; 22:7305-7015.
8. Blaner WS: Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 1989;10:308-316.
9. Vogel S, Gamble MV, Blaner WS: Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. In Nau H, and Blaner WS (eds). *Hand book of experimental Pharmacology, retinoids*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany 1999, pp 31-95.
10. Monaco HL, Rizzi M, Coda A: Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science*: 1995; 268:1039-1041.

11. Soprano DR, Blaner WS: Plasma retinol-binding protein. In Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS, Editors. *The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine*. Raven Press, New York 1994; 257-282.
12. Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS: Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1992; 267:1808-1810.
13. Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny KK, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436:356-362.
14. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA et al.. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552-2563.
15. Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA: Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1886-1890.
16. Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, l'Allemand D, Spinass GA, Zimmerman MB: Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4359-4365.
17. Qi Q, Ye X, Zhao F, Haung P, Hu FB, Franco OH, Wang J, Li H, Liu Y, Lin X: Elevated retinol-binding protein 4 levels are associated with metabolic syndrome in Chinese people. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4827-4834.

18. Krzyanowska K, Zemany L, Krugluger W, Schernthaner GH, Mittermayer F, Schnack C, Rahman R, Brix J, Kahn BB: Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:1115-1122.
19. Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B: Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1168-1171.
20. Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D: Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1971-1974.
21. Lim S, Choi SH, Jeong IK, Kim JH, Moon MK, Park KS, Lee HK, Kim YB, Jang HC: Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol binding protein-4 concentrations in young and middle aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:2263-2268.
22. Kovacs P, Geyer M, Berndt J, Kloting N, Graham TE, Bottcher Y, Enigk B, Tonjes A, Scleinitz D. et al. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein 4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes* 2007; 56:3095-3100.
23. Hu C, Jia W, Zhang R, Wang C, Lu J, Wu H, Fang Q, Ma X, Xiang K: Effect of RBP4 gene variants on circulating RBP4 concentration and type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet Med* 2008; 25:11-18.

24. Broch M, Vendrell J, Ricart W, Richart C, Fernandez-Real JM: Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care* 2007;30:1802-1806.
25. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L: Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007; 195:e150-e158.
26. Silha JV, Nyomba BL, Leslie WD, Murphy MJ Ethnicity, insulin resistance, and inflammatory adipokines in women at high and low risk for vascular disease. *Diabetes Care* 2007; 30:286-291.
27. Yagmur E, Weiskirchen R, Gressner AM, Trautwein C, Tacke F: Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care* 2007; 30:1168-1172.
28. Graham TE, Wason CJ, Bluher M, Kahn BB: Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* 2007; 50:814-823.
29. Keilson B, Underwood BA, Loerch JD: Effects of retinoic acid on the mobilization of vitamin A from the liver in rats. *J Nutr* 1979; 109:787-795.
30. Bhat PV, Lacroix A: Effects of retinoic acid on the metabolism of vitamin A in rat liver. *Nutr Res* 1986; 6:429-435.
31. Bhat PV, Lacroix A: Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;69:826-830.

32. McClean SW, Ruddel ME, Gross EG, DeGioanna JJ, Peck GL: Liquid-chromatography assay for retinol (vitamin A) and retinol analogs in therapeutic trials. Clin Chem 1982; 28:693-696.
33. Zang Y, Proenca R, Maffel M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and human homologue: Nature, 1994, 372:425-432.
34. Genuth SM, Przybylski RJ, Rosenberg DM: Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice. Endocrinology 1971; 88:1230-1238.
35. Bonet ML, Ribot J, Felipe F, Palou A: Vitamin A and the regulation of fat reserves. Cell Mol Life Sci 2003;60:1311-1321.
36. Villarroya F, Giralt M, Iglesias R: Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. Int J Obes Relat Metab Disord 1999; 23:1-6.
37. Filepe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A: Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. Diabetes 2004; 53:882-889.
38. Berry CB, Noy N: All-*trans* retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor β/δ and retinoic acid receptor. Mol Cell Biol 2009; 29:3286-3296.
39. Mercader J, Granados N, Bonet ML, Palou A: All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. Cell Physiol Biochem 2008; 22:363-372.
40. Lenhard JM: PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. Receptors Channels 2001;7:249-258.
41. Shin DJ, Odom DP, Scribner KB, Ghoshal S, McGrane MM: Retinoid regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in liver. Mol Endocrin 2002; 16:39-54.

42. Motani A, Wang Z, Conn M, Siegler K, Zang Y, Liu Q, Johnstone S, Xu H, Thibault S. et al. Identification and characterization of a non-retinoid ligand for retinol-binding protein 4 which lowers serum retinol-binding protein 4 levels *in vivo*. J Biol Chem 2009; 284:7673-7680.
43. Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. EMBO J 1999; 18:4633-4644.
44. Biesalski HK, Frank J, Beck SC Biochemical but not clinical vitamin A deficiency results from mutations in the gene for RBP4. Am J Clin Nutr 1999; 69:931-936.
45. Mills JP, Furr HC, Tanumihardjo SA: Retinol to retinol-binding protein (RBP) is low in obese adults due to elevated apo-RBP. Exp Biol Med 2008; 233:1255-1261
46. Erikstrup C, Mortensen OH, Nielsen AR, Fischer CP, Plomgaard P, Petersen AM, Krogh-Madsen R, Lindegaard B, Erhardt JG. et al. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with T2DM: Diabetes Obes Metab 2009; 11:204-212.
47. Warner JE, Larson AJ, Bhosale P, Digre KB, Henley C, Alder Sc, Katz BJ, Bernstein PS: RBP and retinol analysis in cerebrospinal fluid and serum of patients with and without idiopathic intracranial hypertension. J Neuroophthalmol 2007; 27:258-262.
48. Libien J, Blaner WS: Retinol and retinol-binding protein in cerebrospinal fluid: can vitamin A take the “idiopathic” out of idiopathic intracranial hypertension? J Neuroophthalmol 2007;27:253-257.

Figure legends

Figure 1: Growth curve of RA⁻ (a) and RA⁺ (b) *ob/ob* mice during 16-d treatment. Values are mean \pm SEM, n=7-8 in each group. Asterisks indicate different from RA⁻ at that time; $P < 0.05^*$ and $P < 0.01^{**}$ (b versus a).

Figure 2: Basal blood glucose concentrations in RA⁻ (a) and RA⁺ (b) *ob/ob* mice on day 9 and 16. Values are mean \pm SEM, n = 6-8, $P < 0.001^{***}$ different from RA⁻ at that time (b versus a)

Figure 3: IPGTT (A) and IPITT (B) in RA⁻ (a) and RA⁺ (b) *ob/ob* mice on day 15 and 16 respectively (n=5- 8). Glucose concentrations were normalized to the time zero concentration of the RA⁻ group (a) and plotted as % change overtime. Values are mean \pm SEM, asterisks indicate different from RA⁻ at that time; $^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$; $^*p < 0.05$ (b versus a).

Figure 4: Serum RBP4 concentrations (A,B) and the serum retinol RBP4 ratio (C) in RA⁻ and RA⁺*ob/ob* mice and in lean mice on day 16. (A) Representative Western blotting of RBP4 in serum. In B and C, values are mean \pm SEM, n=8 except lean, n=4. Means without a common letter differ; $P < 0.05$.

Supplemental Figure: HPLC sensitivity on separation of ROL extracted from the serum of RA⁻ and RA⁺*ob/ob* mice and lean controls, available with this paper at jn.nutrition.org

FIGURE 1

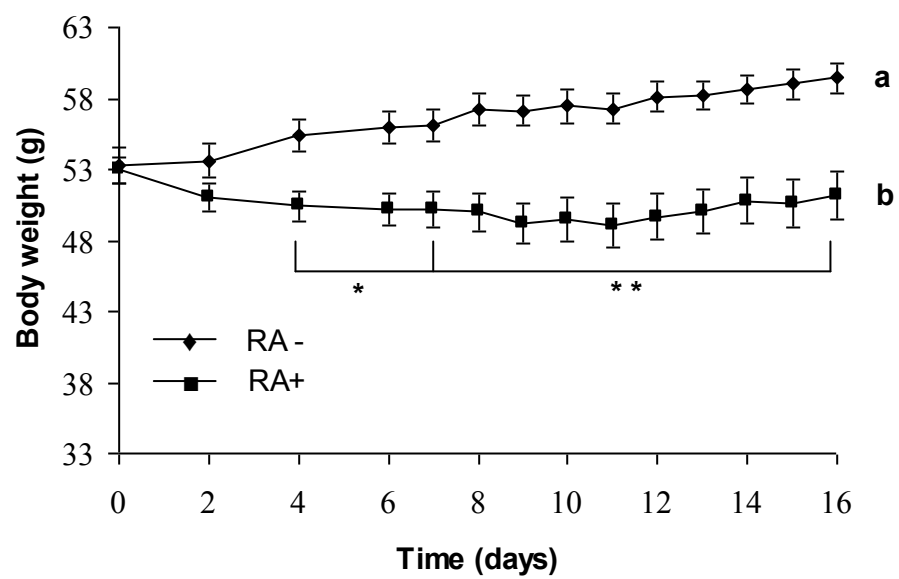


FIGURE 2

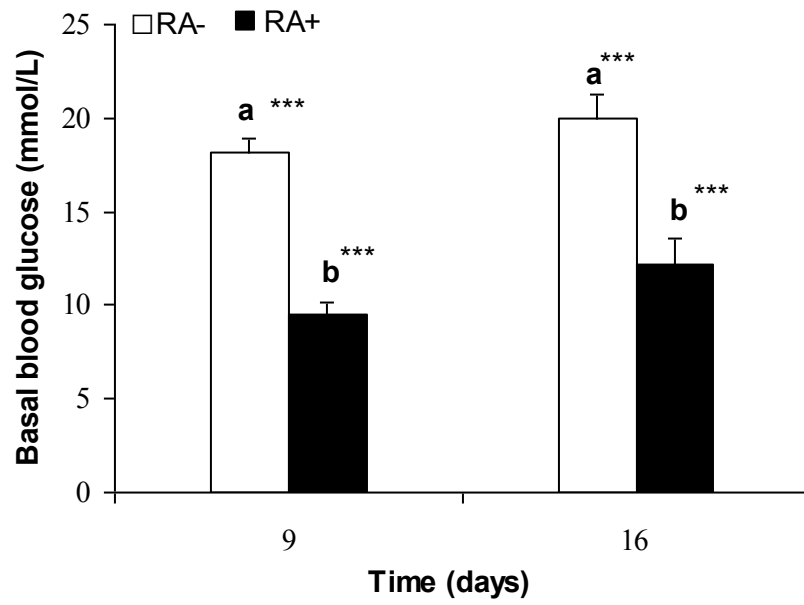


FIGURE 3

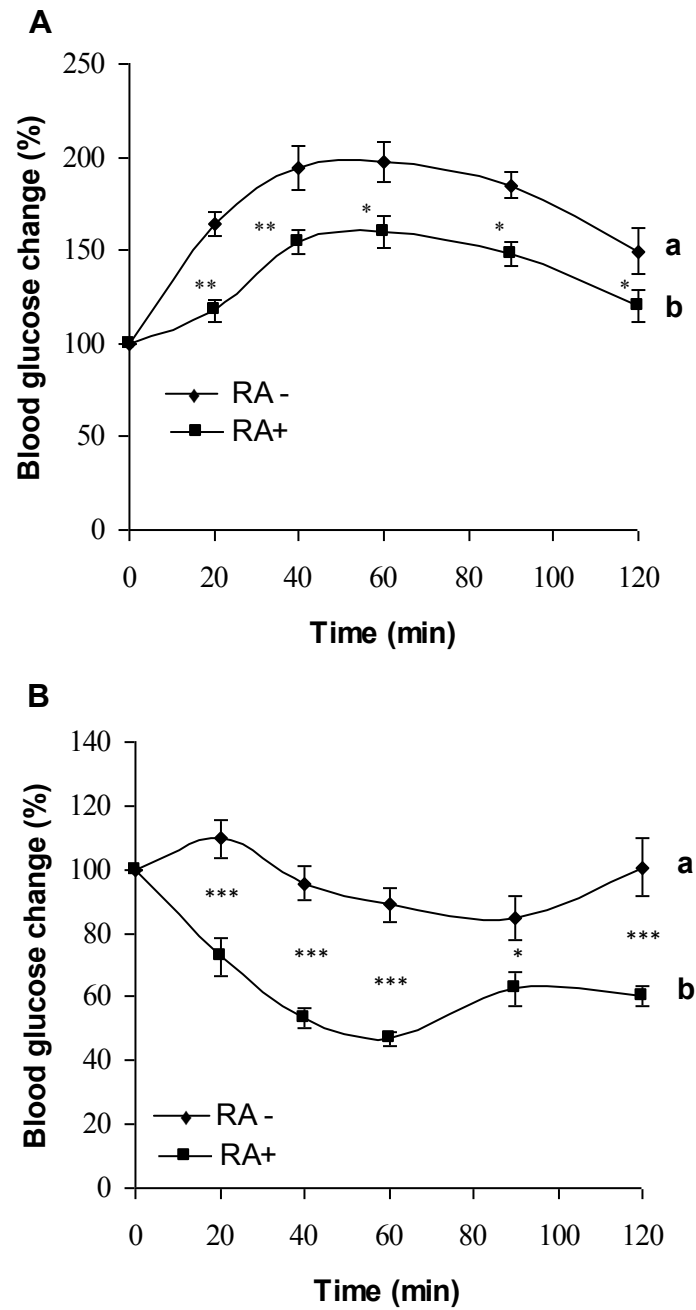
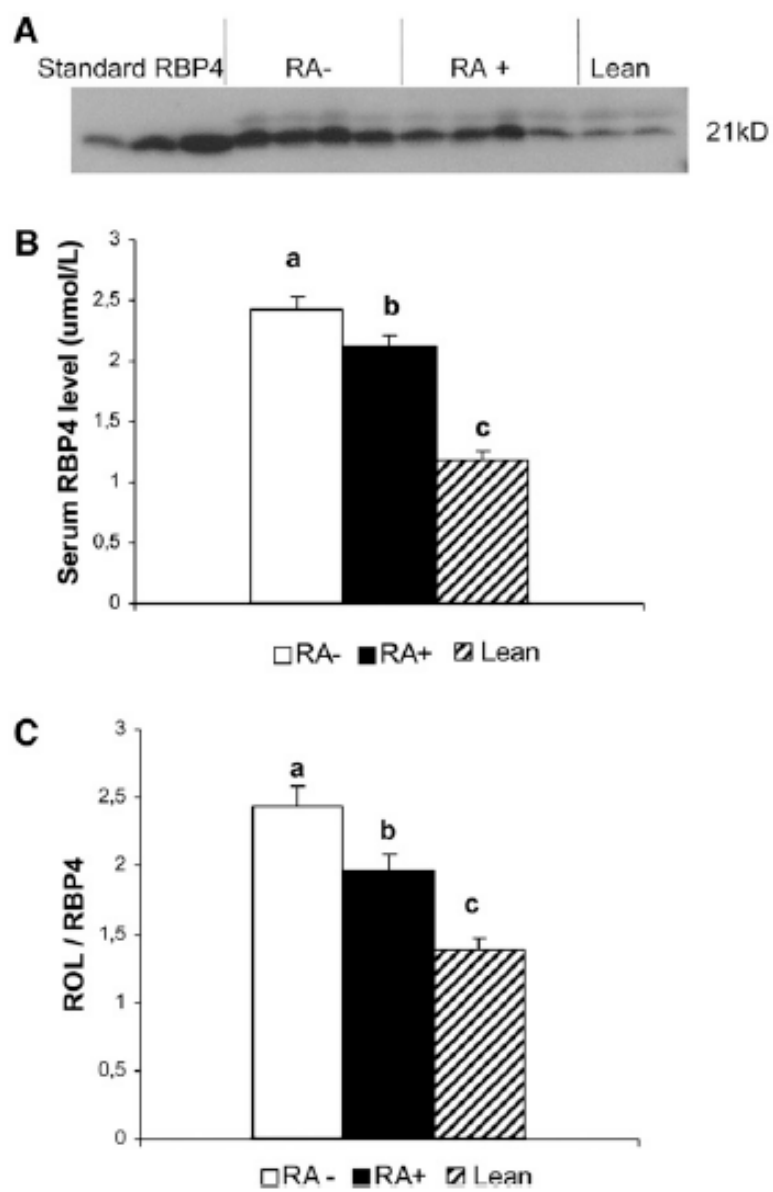
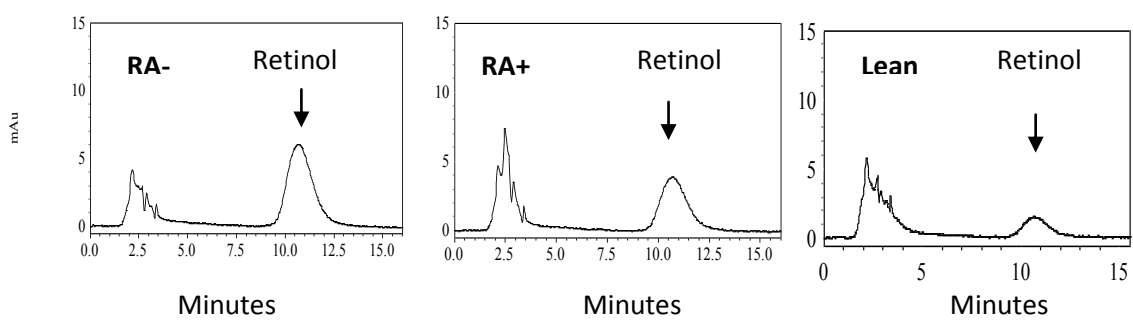


FIGURE 4



SUPPLEMENTAL FIGURE



CHAPITRE 6: Article 2, *abstracts* indexes publiés APNM 2012,2015

Retinoic Acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy and promotes beige/brown fat characteristics in diabetic mice

Daniel-Constantin Manolescu, Aurélia Sima, Sylvie Mader and Jean-Louis Chiasson

Publication des données préliminaires par *Abstracts* indexés, dans les journaux suivants:

Manolescu DC. et al, 2015, *App. Physiology, Nutrition & Metab.* 40(5):518(495-533)/05.2015

Manolescu DC et al 2013, *Journal Nutrigenetics & Nutrigenomics* 6(4-5):233(201-255)/10.2013

Manolescu DC.et al, 2013, *App. Physiology, Nut. & Metabolism*, 38(4):463(433-476)/04.2013

Manolescu DC.et al, 2013, *Diabetes & Metabolism*, 39(1):A44/03.2013

Manolescu DC. et al. 2012, *Dietetistes Québec*, 9(3):22/Hiv.02-03.2012

Contribution des auteurs

Daniel-Constantin Manolescu a contribué de façon déterminante à l'élaboration de ce projet à tous les niveaux, et particulièrement par la définition des hypothèses et des objectifs, les revues de littérature, le choix des protocoles et la mise au point des techniques, le management administratif et financier, la réalisation des expérimentations, l'analyse, l'interprétation, la discussion et la présentation des résultats, la rédaction du manuscrit, la soumission pour publication et les réponses aux réviseurs. Par son esprit d'initiative, son efficacité et son autonomie, il a enrichi le projet et a contribué à augmenter sa productivité en résultats, publications et perspectives de recherches pour passer à des études cliniques chez l'humain.

Le présent projet de recherche s'inscrit en continuité avec l'expertise de plus de 35 ans en analyse HPLC et métabolisme des rétinoïdes du directeur initial, le Dr P. V. Bhat. Il a vérifié les techniques et la qualité des expérimentations et contribué à leur design et à l'analyse primaire des résultats, prenant les décisions relevant du directeur jusqu'à son départ à la retraite en juin 2014. Il a offert ensuite une expertise consultative occasionnelle.

Dr. ing. Aurélia Sima, PhD a contribué par : RTqPCR, WB, l'analyse mathématique des résultats, les calculs statistiques et les présentations graphiques sous forme de figures et tableaux. Elle a également participé aux séances de « *brainstorming* » pour la double validation des initiatives du premier auteur du projet, M. Daniel Constantin Manolescu.

Dr Bogdan A Danalache a contribué par : l'analyse microscopique de coupes histologiques des tissus adipeux, participant à leur montage sur lamelles et colorations HE, faites ensuite dans l'unité d'histopathologie du CHUM. Il a désiré seulement des « *Acknowledgements* ».

Dr Donghao Wang, expert en génomique, a contribué par des vérifications et conseils techniques de MSc. Manolescu DC et Dr. Sima A pour des RTqPCR, analyse mathématique de résultats, des statistiques et des présentations. Il est ici reconnu en « *Acknowledgements* ».

Dr. Yolanta Gutkowska nous a aimablement donné sa permission d'utiliser les expertises des Drs. Danalache BA et Wang D ainsi que les appareils de son laboratoire, en marge de travaux communs de notre collaboration pour l'article 3 suivant dans cette thèse. « *Acknowledgement* !

Dr. Jacques Turgeon nous a aimablement donné sa permission d'utiliser l'expertise technique et les appareils de son laboratoire (RTqPCR) de façons ponctuelles. « *Acknowledgements* »!

Le codirecteur, Dr Jean-Louis Chiasson a pris la relève après le départ à la retraite du Dr P.V. Bhat en juin 2014, assurant la continuité du projet par sa direction administrative, supervision et sa contribution à améliorer la qualité de l'écriture du manuscrit pour soumission.

La codirectrice, Dr Sylvie Mader, a pris également la relève après le départ à la retraite du Dr P.V. Bhat, assurant la survie du projet par son implication financière, sa supervision, stratégie et sa contribution à améliorer la qualité de l'écriture du manuscrit pour soumission.

La Dr Bénédicte Fontaine Bisson a révisé l'anglais du manuscrit; « *Acknowledgement* »! Suite à sa mise à la retraite, le Dr Pangala V. Bhat a demandé d'être nommé seulement en « *Acknowledgement* » de cet article.

**Retinoic acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy
and promotes beige/brown fat characteristics in *ob/ob* diabetic mice**

Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Aurélia **Sima**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹

¹*Research Group in Diabetes and Metabolism, Cardiometabolic axis, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu (CRCHUM); Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Immunology and Cancer Research Institute (IRIC); Department of Biochemistry, Université de Montréal, Québec, Canada*

2017-2018

Editing Certificate obtenu pour soumission au groupe scientifique **ELSEVIER**, en Annexes.

Acronyms and Abbreviations

ACRTN = apo-carotenal

ACRTNA-A = apo-carotenoic acid

ADH = alcohol dehydrogenase

ARAT = retinolacyltransferase

AUC = area under the curve

BAT = brown adipose tissue

BBG = basal blood glucose

β-CRTN = beta-carotene

BCO-I = β-carotene mono-oxygenase

BCO-II = β-carotene di-oxygenase

BNP = brain natriuretic peptide

CIDEA = cell death activator

CMA = chaperon mediated autophagy

CM = chylomicrons

CMR = chylomicrons remnants

COX-II = cytochrome oxidase

CPT = carnitine palmitoyltransferase

CRABP = cellular RA binding protein

CRBP = cellular retinol binding protein

CYP 26 = cytochrome polypeptide family 26

FGF21 = Fibroblast growth factor 21

HAT = histone acetyltransferase

HDAC = histone deacetylase

HE = hematoxylin eosine staining

HPS = haematoxylin phloxin safrane

IPGTT = intra-peritoneal glucose tolerance test

IPITT = intra-peritoneal insulin tolerance test

IR = insulin resistance

LDL = low density lipoprotein

LIV = liver

LPL = lipoprotein lipase

LRAT = lecithin: retinol acyltransferase

NAD = nicotinamide adenine dinucleotide

NAD⁺ = NAD derived oxidation agent

NADH = NAD derived reduction agent

NADP = NAD phosphate

NADP⁺ = NADP derived oxidation agent

NADPH = NADP derived reduction agent

Normalisation = always referred as « toward healthy lean control animals profile »

OPM = oxidate polar metabolites

PGC1α = Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α

PPAR = Peroxisome proliferator-activated receptor

PRDM16 = PR domain zinc finger protein16

RA = retinoic acid (form of vitamin A)

RAL = retinal (form of vitamin A)

RALDH = retinaldehyde dehydrogenases (RALDH1 as for ALDH1A1, and RALDH2 as for ALDH1A2)

RAR = retinoic acid receptor

RARE = retinoic acid response element

RBP (RBP4) = retinol binding protein

RDH = retinol dehydrogenase

RE = retinyl esters

REH = retinyl esters hydrolase

ROL = retinol (form of vitamin A)

RXR = retinoid X receptor

SF = subcutaneous fat

SM = skeletal muscle

STRA6 = stimulated by RA gene 6

T2DM = type 2 diabetes mellitus

TR = thyroid hormone receptor

TTR = transthyretin

UCP1 = uncoupling protein 1

VF = visceral fat

VLDL = very low density lipoprotein

WAT = white adipose tissue

Abstract

Introduction: We have previously demonstrated that retinoic acid (RA) treatment in obese diabetic mice (ob/ob) reduces levels of serum vitamin A (ROL) and its transporter (RBP4), fasting glycaemia, insulin resistance (IR), body weight (bw) and visceral adipocyte diameter despite similar food intake (g) and motor reflexes in RA and in vehicle only treated groups.

Aims: To determine whether RA affects: **1)** vitamin A metabolism gene expression for uptake, transport, storage, oxidation and nuclear receptors; **2)** the concentrations of ROL and retinyl esters (RE) and **3)** RBP4, in subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), skeletal muscles (SM) and liver (LIV); **4)** expression of PGC1 α and UCP1, two genes characteristic of beige/brown fat metabolism; and **5)** adipocyte morphology.

Methods: Sixteen 9-week old B6.V-Lep/J ob/ob mice obese and IR were treated by stomach intubation for 16 days as follow: 8 were treated with 100 μ g *at*RA (2 μ g/gbw/day) in 100 μ L corn oil (vehicle), and 8 with vehicle only serving as obese diabetic controls. Eight lean and healthy mice served as healthy controls. Gene expression (mRNA) was evaluated by qRT-PCR, RBP4 protein levels by WB, retinoid levels by HPLC, and fat morphology by staining histological observation. Motor reflex was evaluated by tail suspension (SHIRPA protocol).

Results: RA treatment: **1)** induced tissue-specific (SF, VF, SM, LIV) modulations of gene expression for vitamin A metabolism; **2)** normalized ROL concentrations in SF, VF, SM and RE concentrations in SM and LIV; **3)** normalized RBP4 protein levels in SF, VF and LIV; **4)** increased PGC1 α and UCP1 gene expression in fat tissues; **5)** reduced adipocyte hypertrophy; **6)** increased the poly unsaturated fatty acids (PUFAs) liquid fraction (cryoseparation at -20°C) and ;**7)** seemed to increase angiogenesis and autophagy, in the adipose tissue.

Conclusions: RA treatment induces tissue-specific retinoid metabolism gene expression improving vitamin A homeostasis, and reduces adipocyte size and body weight despite similar food intake between treated and not treated ob/ob mice groups, suggesting improvement in energy metabolism. Increased PGC1 α and UCP1 (mRNA), angiogenesis, PUFAs fraction, probable autophagy, and specific tissue morphology, suggests beige/brown fat presence.

Keywords: retinoic acid, vitamin A metabolism, RBP4, PGC1 α , UCP1, PUFA, beige/brown fat, angiogenesis, autophagy, obesity, insulin resistance, diabetes.

Introduction

Many studies have found that vitamin A and its metabolites are involved in the regulation of adipogenesis, insulin sensitivity and glucose homeostasis (Bonet et al. 2012, Landrier et al. 2012, Manolescu et al. 2010, Mercader et al. 2006, Rhee and Plutzky 2012, Sima et al. 2011). Retinoic acid (RA), an active vitamin A metabolite, is essential for embryogenesis and cell differentiation (Clagett-Dame and DeLuca 2002, Ross S. A. et al. 2000b). RA regulates gene expression by binding and activating the nuclear receptors RARs and RXRs (Chambon P. 1996). Dietary vitamin A (animal and vegetal source) is esterified in the enterocytes (MacDonald and Ong 1988) then incorporated into chylomicrons and secreted into the circulation via the lymphatic system (MacDonald and Ong 1988, Ross AC and Zolfaghari 2004, Ross AC et al. 2001). Other retinoids are also found in the blood, such as: retinyl esters (RE) incorporated mainly in low density (LDLs) and very low density (VLDLs) lipoproteins (Hussain et al. 1991); water soluble β -glucuronides of ROL and RA (Quadro L et al. 2003); carotenoids incorporated into chylomicrons, LDLs and VLDLs and *all-trans* and *13-cis* RA linked to albumin (Li Y. et al. 2014). In the circulation, chylomicrons are converted into chylomicron remnants, of which approximately 75% are cleared by the liver (Cooper 1997) and 25% by extra-hepatic tissues (Blomhoff and Blomhoff 2006, Goodman DS et al. 1966, Goodman D. S. 1974). The ROL is either oxidized to retinal (RAL) and then to RA, or esterified as RE (Blomhoff et al. 1991) and stored mainly in hepatic stellate cells (Blaner WS et al. 2009). From the liver, RE are hydrolysed to ROL and transported in a 1:1 molar ratio to extra-hepatic tissues by retinol binding protein 4 (RBP4), synthesized in hepatocytes (Blaner W. S. 1989). In the circulation, the ROL-RBP complex (holo-RBP4) interacts strongly with circulating transthyretin (TTR) in a 1:1 molar ratio to prevent rapid glomerular filtration by the kidney (Quadro L et al. 2003). RBP4 is also synthesized in adipose tissues (Tsutsumi et al. 1992) and released into the circulation, where its level has been found to correlate with obesity and insulin resistance (Graham TE et al. 2006b). Circulating holo-RBP4 delivers ROL to retinoid-responsive cells, where it can be esterified into RE (storage) or oxidized to RAL and subsequently RA (Bhat and Lacroix 1983b, Napoli JL 1996b). RA is an important regulator of adipocyte differentiation (Villarroya et al. 1999) via the RA-nuclear receptors RARs and RXRs (Alemán et al. 2004). Vitamin A deficiency is associated with increased fat deposition, and the adipocytes are dynamically involved in retinoid storage and metabolism (Tsutsumi et al. 1992). On the other hand, RAL inhibits adipogenesis by

suppressing RXR responses *in vitro* (Ziouzenkova O. et al. 2007b), reducing fat accumulation and improving insulin sensitivity in diabetic mice (Reichert et al. 2011). However, limited information is available regarding the metabolic implications of vitamin A in diabetes (Rhee and Plutzky 2012).

Our laboratory has previously demonstrated that RA treatment in obese and IR ob/ob mice decreases serum ROL and RBP4 levels, fasting blood glucose concentrations, IR, body weight and visceral adipocyte size despite similar food intake (g) in treated and non-treated animals (Manolescu et al. 2010) (Manolescu et al. 2014). The RA treatment also increased the mRNA expression levels of the cardiac hormones ANP and BNP in cardiomyocytes (Manolescu et al. 2014). Both of these cardiac hormones can induce brown fat (Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012). In the present study, we postulated that these RA-related effects could be associated with RA influence on : **1)** the expression of genes involved in vitamin A uptake (STRA6), transport (RBP4, CRBP, CRABP), storage (LRAT), oxidation (RDH, RALDH), catabolism (CYP26A1 and CYP26B1) and nuclear receptors (RAR, RXR) in subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), skeletal muscle (SM) and liver (LIV); **2)** the concentrations of vitamin A (ROL, RE) and **3)** RBP4 protein in the same tissues; **4)** the expression in SF and VF of two genes (PGC1 α ; UCP1) known to be involved in mitochondrial bio-genesis and brown/beige fat metabolism; and **5)** the adipocyte morphology in SF and VF; which influences vitamin A homeostasis and fat tissue remodelling.

Materials and methods

Mice manipulation and treatment

The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Montréal Research Centre (CRCHUM). Detailed descriptions of our experimental protocols, mice and diets can be found in our previous publications (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010). Briefly, sixteen 9-week-old female B6.V-Lep/J ob/ob mice were obtained from Jackson Laboratory Bar Harbor, ME, USA. This transgenic mouse strain is leptin-deficient (*Lep* $^{-/-}$) and exhibits lethargy, a low basal metabolic rate, hyperphagia, obesity and metabolic abnormalities such as insulin resistance and hyperglycaemia, reminiscent of human type 2 diabetes (Drel et al. 2006, Zhang Y. et al. 1994). Several leptin transgenic mouse strains (e.g., ob/+, ob/ob, db/+, db/db) are engineered by the provider Jackson Laboratory from

normal C57BL/6 mice. Mice were acclimatized to their new environment for a standard one week before experimentation and were housed (4 per cage) under environmentally controlled conditions with room temperatures at 25 degrees Centigrade and a 12-hour light/dark cycle, with free access to water and a balanced standard rodent pellet diet (no. 2018, 18% protein for rodents, Harlan Teklad). Their diet composition consisted of (in g/kg): crude protein, 188; crude oil, 60 (total saturated fat, 9.6; total monounsaturated fat, 12.8; and total polyunsaturated fat, 34.1); crude fibre, 38; carbohydrates, 500 (starch, 450; sugar, 50); mineral mix, 32.05; vitamin mix, 2.9; providing a total overall energy of 13.7 kJ/g, as guaranteed by the manufacturer. The animals were randomly divided into 2 groups: Group 1 received daily supplementation of 100 μ g *at*RA (2 μ g/gbw/day) in 100 μ L of corn oil (vehicle) administered by stomach intubation (ob/ob+RA; n=8), and Group 2 received the vehicle only and served as obese controls (ob/ob; n=8). A group of 10-week old lean mice (C57BL/6 strain; n=8) obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, Québec, Canada) and fed the same standard rodent pellet diet served as healthy lean controls. Since blood glucose decreased significantly with RA treatment after 1 week and remained reduced after 2 weeks, the animals were euthanized on day 16, after an 8-hour fast and 24 hours after the last dose of RA treatment (Manolescu et al.2010). The ob/ob transgenic mice are particularly lethargic, have lower body temperatures than normal mice (Klaus et al. 1998, Landsberg et al. 2009), have a low metabolic rate and exhibit very low physical activity, as guaranteed by the producers, usually in metabolic cage and by SHIRPA protocols for locomotor and coordination evaluations (Hatcher et al. 2001). Our animals were housed according to the producer's recommendations (Manolescu et al. 2010) and exhibited the expected low motor phenotype. We observed the locomotor activity and body positions in their cages twice a day (morning and evening) as well as their touch-escape responses and locomotor reflex movements during a 10 second suspension-by-tail every morning throughout the experiment. To avoid additional stress this was performed quickly in the course of their daily treatment routine and not as a supplementary manipulation. Mice maintained good appetites, and no specific signs of stress were noted (Manolescu et al. 2010). Based on observational qualitative assessment (e.g., SHIRPA protocol for reflex movements), all mice were determined to be lethargic, and their locomotor reflex activity was similar between RA treated and untreated mice. After euthanasia, samples of adipose tissues, skeletal muscle and livers were collected, cut into 200- to 300-mg pieces and snap-frozen in liquid nitrogen for storage until subsequent

analysis. Subcutaneous fat (SF) was obtained from inguinal and flank regions, and visceral fat (VF) was obtained from paired gonadal and mesenteric regions, considered to be white fat (WAT) in murine anatomy (Casteilla et al. 2008).

RT-qPCR analysis for comparative gene expression (mRNA) in tissues

Total RNA was extracted from adipose, skeletal muscle and liver tissues with TRIZOL, according to the instructions provided by the manufacturer (Invitrogen, Toronto, ON, Canada). Tissue samples (200–300 mg) were homogenized in 1 mL TRIZOL reagent and incubated for 5 min at room temperature. The homogenates were centrifuged in an Eppendorf centrifuge at 12,000xg for 10 min at 4°C, and the supernatant was collected. After addition of 0.2 mL of a chloroform/isoamyl alcohol mixture (49:1), the supernatant was shaken vigorously and incubated at room temperature for 5 min, then centrifuged at 12,000xg for 10 min at 4°C, and the aqueous phase was collected. The RNA was precipitated with 0.5 mL of isopropyl alcohol, centrifuged (12,000xg for 10 min at 4°C) and washed twice with 75% ethanol. The RNA pellet obtained was dissolved in 30 µL deionized water. The RNA was reverse-transcribed with an iScript cDNA synthesis kit, as recommended by the manufacturer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The reaction mixture contained a pro-rata sample volume (µL) including 1 µg RNA, 4 µL iScript super mix (5×) and 1 µL iScript reverse transcriptase, with sufficient deionized water to result in a total volume of 20 µL. The reaction was carried out for 5 min at 25°C, 30 min at 42°C, and 5 min at 85°C. Product quality control was performed on an agarose gel by electrophoresis and demonstrated reverse-transcription products as single bands of expected sizes. The reverse-transcription product was diluted 5 times prior to RT-qPCR. The RT-qPCR analysis was performed in a Rotor Gene 3000 (Corbett, Australia). Each RT-qPCR amplification contained the diluted reverse-transcription product (cDNA, 2 µL), forward and reverse primers (300 nmol/L), and 2× iQ SybrGreen mix (Bio-Rad) in a final volume of 20 µL. After denaturation at 95°C for 7 min, the samples went through a 1°C annealing temperature touchdown of 7 cycles starting from 60°C (15 s at 95°C, 15 s at annealing temperature, and 15 s at 72°C), followed by 40 cycles of amplification (15 s at 95°C, 15 s at 58°C, and 15 s at 72°C). A dissociation protocol after the amplification program characterized the amplified products. Each of the primer pairs amplified a single predominant product. The oligonucleotide primers used for RT-qPCR to direct mRNA expression were designed with Primer Blast NCBI Software, resulting in the sequences that are listed in Table 1. Gene expression was measured by relative

RT-qPCR method as reported in (Gutkowska et al. 2007). The relative expression of the RT-qPCR products was determined according to the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Gutkowska et al. 2007). Quality and method efficiency were verified with same CRCHUM laboratory (Gutkowska J, Jankowski M. 2007, 2014). The 18S ribosomal RNA (Quantum 18S, Ambion, Life Tech, Burlington, ON, Canada) served as a gene for normalization given its consistent expression and the prevailing literature (Berry et Noy 2009, Manolescu et al.2014, Sima A et al. 2011).

Retinoid extraction and HPLC measurement in tissues

Retinoids were extracted by homogenizing approximately 200 mg of fat tissues in 700 μ L and 200 mg of skeletal muscle and liver in 1000 μ L of a butanol–acetonitrile mixture (1:1), following the PV Bhat methods (Sima et al. 2011). Then, 72 mg of K_2HPO_4 in 20 μ L of water was added to the extract and vortexed for 30 s. The extract was centrifuged at 14,000xg for 20 min at 4°C to obtain a clear supernatant, and 100 μ L was injected onto an HPLC column using HPLC grade solvents purchased from Fisher Scientific (Toronto, ON). All-*trans* RA, ROL and RE of scientific grade purity were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). HPLC was performed with a Shimadzu LC-10ADVP system equipped with a SIL-HTC auto-sampler and cooling apparatus (Man-Tech, Guelph, ON). Retinoids were separated in a 250 x 4.5 mm Phenomenex 10-ODS analytical column (Phenomenex Inc., Torrance CA) and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (60:40) containing 10 mM ammonium acetate for ROL and a mobile phase of methanol:water (95:5) containing 10 mM ammonium acetate for RE at a flow rate of 1.2 mL/min, according to methods by Bhat P.V. described in Bhat and Lacroix (1983b). Retinoid peaks were identified in a photo diode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) that collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves were obtained with standard pure retinoid solutions (Sigma-Aldrich). Characteristic UV spectra and retention times were identified for retinoid and peak areas were measured at λ_{max} -330 in a Shimadzu model SZ-228 data system.

Measurement of RBP4 levels by quantitative Western Blotting

Tissues (100-200 mg) were homogenized with OMNI TH Homogenizer, in 1 mL RIPA lysis buffer composed of: TRIS(50mM), NaCl(150mM), EDTA(1mM), Na deoxycholate (0.25%), SDS(0.1%), Nonidet P40 (1%), glycerol (5%), protease inhibitors (aprotinin, leupeptin, pepstatin and a trypsin inhibitor at 1mM each), plus PMSF, RNase, and DTT at 1mM

each. The total protein quantity was measured by the Bradford method (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pure human urinary RBP4 (Sigma-Aldrich, USA), which has the same structure as the murine one, served as standard for the RBP4 quantification. Urinary RBP4 is decarboxylated, therefore its molecular weight on WB bands is slightly lower than tissue RBP4. This is normal, and the immune-detection is not affected. Standard solutions of 20, 40, and 80 ng of pure RBP4 and 20 µg total protein from samples (SF, VF, and LIV) were used in the analyses. Total protein was boiled with Laemmli buffer, separated on 15% Tris-glycine SDS-PAGE gels and transferred to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham, Boston, MA, USA). The membranes were blocked for 2 hours at room temperature with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% milk. They were subsequently incubated overnight at 4°C with 1:2000 diluted primary antibody (monoclonal anti-RBP4 raised against full-length mouse RBP4) as recommended for the detection of precursor and mature mouse and human RBP4 (Abcam, Cambridge, MA, USA). The blots were incubated for 1 hour at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase, diluted 1:2000, Abcam, Cambridge, MA, USA). Antibody complexes were visualized by enzymatic chemo-luminescence (chemo substrate kit from Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and the bands were quantified with Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)). Pure RBP4 standard calibration curves (second-order polynomial curves, $r^2 > 0.99$) were plotted to quantify tissue RBP4 level.

Tissue histology and adipocyte morphology

Histology was performed in the licensed Pathology core facility of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM/ Hôtel-Dieu Hospital of Montréal, Qc. Canada) in SF and VF adipose tissues. After tissue embedding in paraffin, sections of 4 to 8µm thick were transversally cut and mounted on polylysine-treated slides (Cat.No.P-4981, Esco, Erie Scientific Co, Portsmouth, NH, USA). The sections were stained with Haematoxylin-Eosin (H & E) and/or Haematoxylin Phloxin Saphrane (HPS). Image treatment and evaluations were made according to methods by Danalache B.A. described in Manolescu et al. (2014). In brief, images were acquired at a magnification of 400x with an inverted microscope Olympus MODEL IX51 equipped with a Q-Imaging QICAMIR Fast Digital 1394 CCD camera and Q-Capture acquisition software. A transferred copy in inverted light was also made, for higher contrast. The area of single cells was calculated from the image of their planar surface using

Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)). The surfaces of at least 1000 cells were analysed manually using Threshold, Watershed and ROY Manager functions and are presented in μm^2 .

Statistical analyses

The results are presented as the means \pm SEM. Differences between groups were assessed by one-way ANOVA with multiple comparisons and followed by Newman-Keuls exact probability testing (Graph Pad Prism, San Diego, CA, USA). Differences with a value of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Effects of RA treatment on genes involved in vitamin A metabolism in ob/ob mice

RA treatment significantly decreased serum ROL and RBP4 levels, suggesting that exogenous RA administration may affect the endogenous metabolism of vitamin A (Manolescu et al. 2010). Therefore, we decided to investigate the expression of genes involved in vitamin A metabolism for ROL uptake (STRA6), transport (RBP4, CRBP, CRABP), storage (LRAT), oxidation (RDH, RALDH), catabolism (CYP26A1 and CYP26B1) and nuclear receptors expressions (RAR, RXR) in subcutaneous fat, visceral fat, skeletal muscles and livers of healthy mice and in obese and diabetic ob/ob mice treated with RA or with the vehicle alone (Fig.1). The expression levels (mRNA) of the membrane receptor STRA6 were significantly decreased in the SM and the VF tissues, while they were increased in the SF. The RA treatment significantly lowered the RBP4 transcripts in SF tissue (Fig. 1A). Treatment with RA increased cellular retinoid transporter CRBP1 expression in SF, SM and LIV tissues (Fig.1A, 1C and 1D). The RA treatment decreased the mRNA levels of LRAT, the enzyme involved in the esterification of retinol, in LIV tissues (Fig.1D). However, LRAT expression was significantly increased in the VF and SM tissues of RA treated mice (Fig. 1B and 1C). The RDH10 enzyme expression (mRNA) was decreased by the RA treatment in the SF (Fig. 1A) and increased in the VF of the ob/ob+RA mice (Fig.1B). The RALDH1 enzyme expression level was lowered by the RA treatment in the SF and increased in the VF, the SM and in the LIV of the ob/ob+RA mice (Fig.1). The RALDH2 expression level, a vitamin A second step oxidation enzyme (irreversible), was decreased in VF and SM (Fig.1B and 1C), while it was increased in SF and LIV (Fig.1A and 1D) after RA treatment. Cellular retinoic acid binding protein 1 (CRABP1) expression was lowered, by the RA treatment, in SF, VF and LIV tissues (Fig.1A, 1B and 1D).

and increased in SM (Fig.1C), while the second cellular retinoic acid binding protein (CRABP2) was decreased in the LIV tissue (Fig.1D) and increased in VF (Fig. 1B). The RA treatment decreased the RA catabolic enzyme CYP26A1 transcripts levels in VF (Fig.1B) and the CYP26B1 levels in SF (Fig.1A) but significantly increased CYP26A1 expression in SF, SM and LIV (Fig. 1A, 1C, 1D) and CYP26B1 transcripts levels in VF, SM and LIV tissues (Fig. 1B, 1C, 1D), suggesting degradation of excess RA into polar metabolites for ultimate elimination in the urine (Frolik et al. 1979). The RA nuclear receptors expression level were decreased for RAR in SM (Fig.1C) and for RXR in SF, VF and SM (Fig.1A, 1B, and 1C), and increased for RAR in SF and LIV tissues (Fig. 1A, 1B and 1D). These observations suggest our RA treatment modulates the expression of genes involved in vitamin A metabolism in a tissue-specific manner (SF, VF, SM, and LIV).

Effects of RA treatment on tissues vitamin A concentrations

We previously showed that RA supplementation significantly decreased serum ROL in obese and insulin-resistant mice (Manolescu et al. 2010) and have now demonstrated that it influences expression levels of genes involved in vitamin A metabolism (Fig.1). As such, it is highly probable that exogenous RA may affect vitamin A homeostasis in tissues. We therefore investigated vitamin A (ROL and RE) concentrations in subcutaneous fat, visceral fat, skeletal muscle and livers in ob/ob mice treated with RA (Fig.2). The RA treatment significantly decreased ROL levels in SF, VF and SM as well as RE levels in SM and significantly increased RE levels in SF, VF and LIV. Thus, total vitamin A (ROL + RE) was increased in SF, VF and LIV (Fig.2A, 2B, 2D) but not in SM (Fig.2C). Interestingly, RA decreased vitamin A concentrations to values close to the healthy lean control mice for ROL in SF, VF and SM (Fig. 2A, 2B, 2C) but only in SM for RE (Fig.2C). On the other hand, the RE levels increased in SF, VF and LIV (Fig.2A, 2B, 2D) in ob/ob treated mice, reaching values in the LIV comparable to those of the healthy lean control mouse livers (Fig.2D). The RA treatment normalized ROL concentrations in SF, VF, and SM, and RE concentrations in the SM and LIV while increasing total vitamin A (ROL+RE) concentrations in SF, VF, and LIV.

Effects of RA treatment on RBP4 concentrations in liver and fat tissues

A previous study from our laboratory showed that RA treatment lowered serum RBP4 and ROL concentrations while improving insulin sensitivity in ob/ob mice (Manolescu et al. 2010). Furthermore, in the present study, RA treatment significantly reduced RBP4 mRNA expression levels in SF (Fig.1A), suggesting that decreased RBP4 concentrations in the serum of RA treated ob/ob mice (Manolescu et al. 2010) could be due in part to decreased synthesis and secretion of RBP4 from fat tissues (Yang et al. 2005). In the present study, the RBP4 protein concentrations were measured in SF, VF and LIV tissues. The RA treatment significantly increased the RBP4 protein concentrations to values comparable to lean control mice in all tested tissues (Fig. 3A, 3B, 3C). Figure 3D shows several representative Western Blots for each tissue.

Effects of RA on two key genes involved in mitochondria biogenesis and fat metabolism

In our previous studies, we found that our RA treatment in ob/ob diabetic mice reduces body weight and visceral adipocyte size, despite similar iso-caloric food intake in RA treated and non-treated mice (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010) suggesting an improved energy metabolism. Retinoid have been reported to influence energy homeostasis and to induce beige/brown fat generation (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013, Villarroya et al. 2004). We therefore investigated in the SF and VF tissues the transcripts levels (mRNA) of two specific genes (PGC1 α and UCP1) known to be involved in mitochondrial biogenesis and beige/brown fat metabolism. Indeed, we found the expression levels of both genes significantly increased in both fat tissues with RA treatment (Fig.4A;B). Interestingly, this was associated with smaller diameters of adipocytes (Fig.5A;B) and reduced body weights and visceral adipocyte sizes, despite similar food intake levels as previously reported (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010).

Effects of RA treatment on fat tissue morphology

We have previously demonstrated a reduction in body weight with RA treatment despite similar food intake levels of treated and untreated ob/ob mice (Manolescu et al. 2010) along with a significant reduction in the visceral fat adipocytes size in RA treated animals (Manolescu et al. 2014). In the present study, RA treatment was found to be associated with modifications in shape and a significant reduction in size of subcutaneous and visceral adipocytes in ob/ob+RA mice (Fig 5 A; B and Fig.6B) and with increased polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the adipose tissue of RA treated mice, documented by cryoseparation of liquid

and solid phases at -20°C. Interestingly, we also observed a higher expression (mRNA) of PGC1 α and UCP1 genes in SF and VF tissues (Fig.4A;B). This is consistent with other reports demonstrating that retinoid (RA, RAL) influences energy homeostasis and induces beige/brown fat development (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013, Villarroya 1998). We only briefly noticed several limited granules suggesting autophagy-like profiles in SF and VF of ob/ob+RA mice, similar to observations in lean mice and different from those in non-treated ob/ob mice (Fig.5A;B and Fig.6B). We also noticed limited morphologic structures suggesting early capillary infiltration (angiogenesis) in treated ob/ob+RA fat (Fig.5A; B and Fig.6B).

Discussion

Obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes are closely associated metabolic disorders that have reached epidemic proportions worldwide. They share several characteristic features, such as insulin resistance, impaired insulin secretion, dyslipidemia, and a chronic inflammatory response (Kahn and Flier 2000). Ob/ob leptin-deficient mice are commonly used in research because of their obesity, insulin resistance, hyperglycaemia and other features resembling human type 2 diabetes (Drel et al. 2006, Zhang Y. et al. 1994). The ob/ob mice are lethargic and have a low basal metabolism (Klaus et al. 1998, Landsberg et al. 2009). They are not vitamin A deprived, and their obesity and diabetes does not come from a vitamin A impoverished diet. In North America, lack of vitamin A availability in the diet is not an issue. Our laboratory has previously reported that RA treatment of ob/ob diabetic mice lowered serum glucose concentrations, improved insulin sensitivity and significantly reduced serum ROL and RBP4 concentrations and body weight, despite similar food intake, compared to non-treated animals (Manolescu et al. 2010). Furthermore, RA treatment reduced visceral fat in ob/ob mice (Manolescu et al. 2014). These observations, along with findings from other labs, suggests that RA may also regulate vitamin A homeostasis and lipid metabolism (Brun et al. 2013). Higher energy metabolism and beige/brown fat development under retinoid influence has also been reported in parallel and after our RA treatments (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013, Villarroya et al. 2004). In the present study, we found that a low doses RA treatment in ob/ob mice modulated the expression levels of genes involved in vitamin A metabolism in a tissue-specific manner (SF, OF, SM, LIV), normalizing vitamin A concentrations in SF (ROL), VF (ROL), SM (ROL, RE) and LIV (RE), as well as RBP4 protein concentrations in SF, VF

and LIV tissues close to those of control lean mice. In both SF and VF, we found increased mRNA expression levels of PGC1 α and UCP1, two genes involved in mitochondrial biogenesis (Austin and St-Pierre 2012) and in beige/brown fat metabolism (Chen H. Y. et al. 2013). We also found decreased adipocyte sizes (Fig.5 A;B and Fig.6B) consistent with our previous observations (Manolescu et al. 2014).

RA regulates genes involved in vitamin A metabolism and homeostasis

Many studies have shown increased pro-inflammatory cytokines associated with obesity and insulin resistance (Bastard et al. 2000a, Bastard et al. 2000b). They have also shown that macrophage accumulation in adipose tissues of obese individuals results in further increases in inflammatory cytokines, altering mRNA expression profiles and/or the protein concentrations and bioactivity of enzymes involved in many signalling pathways (Weisberg et al. 2003), including for retinoid and retinoid receptors (Frey and Vogel 2011, Villarroya et al. 1999, Villarroya et al. 2004). Many of these pathways were reported to be sensitive to RA (Berry and Noy 2009, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013), including vitamin A metabolism genes (Berry et al. 2012b, Frey and Vogel 2011, Villarroya et al. 2004). This is consistent with our results showing that RA modulates the expression of vitamin A metabolism genes for ROL uptake (STRA6), transport (RBP4, CRBP, and CRABP), storage (LRAT), oxidation (RDH, RALDH), catabolism (CYP26A1 and CYP26B1) and receptors (RAR, RXR) in the SF, VF, SM, and LIV (Fig.1A, 1B, 1C and 1D) in a tissue specific manner.

STRA6. The cell surface receptor STRA6 facilitates the uptake of retinol from circulating ROL-RBP4 into the cytoplasm (Blaner WS 2007, Kawaguchi et al. 2007) but can also function as a bidirectional transporter, releasing ROL out of cells into the circulation (Berry et al. 2012c, Isken et al. 2008). The STRA6 protein concentrations have been reported to increase from pre-adipocyte to adult adipocyte stages and are also subject to posttranslational regulatory mechanisms (Muenzner et al. 2013, Wu J. et al. 2014, Zemany et al. 2014). In the present study, STRA6 gene expression was undetectable in LIV and had low expression in SM, consistent with previous findings (Bouillet et al. 1997, Muenzner et al. 2013, Pasutto et al. 2007, Szeto W. et al. 2001). Since the liver takes up ROL from circulating chylomicrons, the absence or low expression of STRA6 in the LIV would be expected to prevent the liver from re-absorbing its own secreted ROL-RBP4 (Kawaguchi et al. 2007). In contrast, STRA6 expression levels were high in both SF and VF in ob/ob mice, consistent with previous observations (Berry and

Noy 2012, Muenzner et al. 2013). The RA treatment we tested in the present study normalized the STRA6 expression (mRNA) levels in VF and further increased its expression in SF tissues. This may, at least in part, contribute to the normalization of ROL concentrations in fat tissues (Fig.2A and 2B), improving cellular vitamin A homeostasis. This is consistent with reports of STRA6 signalling in fat tissues (in relation to ROL, RBP4, LRAT and RAR) influencing lipid metabolism and insulin responses and controlling adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis (Berry et al. 2011, Isken et al. 2008, Zemany L et al 2014).

RBP4. In the present study, we found increased expression (mRNA) levels of retinol transporter RBP4 in SF, VF and LIV tissues in untreated ob/ob mice. The oral RA treatment reduced the RBP4 transcripts in the SF and VF (significantly in the SF) of treated ob/ob mice (Fig.1A), suggesting that the lower RBP4 protein concentration in the circulation of treated animals (Manolescu et al. 2010) could be due, in part, to decreased synthesis and secretion of RBP4 from fat tissues (Yang et al. 2005). This is consistent with experiments showing decreased RBP4 synthesis (mRNA) in adipose tissue of different mice, subcutaneously treated with RA for 4 days (Mercader et al. 2008). The majority of circulating RBP4 comes from the liver, and this organ most likely also contributes to the serum RBP4 elevation found in obese and insulin resistant mice (Berry and Noy 2012, Yang et al. 2005) and in obese diabetic humans (Christou et al. 2012, Graham TE et al. 2006b, Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010).

CRBP1. Treatment with RA also increased cellular retinoid transporter CRBP1 expression in all investigated tissues (Fig.1A, 1B, 1C, and 1D). CRBP1 binds ROL, facilitating ROL esterification to RE, under the catalytic regulation of LRAT and/or ARAT enzymes (D'Ambrosio et al. 2011). CRBP1 can also bind RAL for specific oxidation to RA (Noy 2000). CRBP1 protects ROL from oxidative degradation or isomerisation (Ross AC 1993a, b), enhancing the efficiency of enzymatic transformation (Napoli JL 2000) to RE or to RAL and subsequently to RA (Blomhoff and Blomhoff 2006). In vitro silencing of CRBP1 was associated with increased cell differentiation in 3T3-L1 pre-adipocyte and mouse embryonic fibroblasts. It appears that CRBP1 can inhibit pre-adipocyte differentiation (Frey and Vogel 2011), and decreasing or inhibiting CRBP1 expression leads to increased adipogenesis (Zizola et al. 2010). Furthermore, CRBP1/KO mice show higher metabolizing rates of vitamin A in liver, resulting in a 50% reduction in vitamin A hepatic stores as RE (Matt et al. 2005). Therefore, higher levels of CRBP1 repress adipogenesis, induce smaller adipocytes and, for the same body mass index,

are associated with superior insulin sensitivity and glucose tolerance in obese diabetic mammals (Frey and Vogel 2011) and higher RE hepatic stores (Matt et al. 2005). Consistent with these observations, our RA treatment in ob/ob mice normalized hepatic RE concentrations (Fig.2D), reduced adipocyte sizes (Fig.5) (Manolescu et al. 2014) and improved insulin sensitivity and glucose homeostasis (Manolescu et al. 2010).

LRAT. The lecithin: retinol acyltransferase, is the principal ROL esterification enzyme (Li Y. et al. 2014). LRAT is also involved in cell signaling with RBP4 and STRA6 (Marwarha et al. 2014). Complementary to the hepatic principal reserve of RE, adipose tissue (SF, VF) can also store vitamin A as RE up to 20% of the total body retinoid (Tsutsumi et al. 1992). Indeed, we found that LRAT was highly expressed (mRNA) in LIV and fat tissues (higher in SF), but lower in SM of ob/ob mice, compared with lean mice. RA improved slightly the LRAT expression in SM and in LIV compared to the lean controls while it induced a major increase in the enzyme expression in VF (Fig.1). This is compatible with the accumulation of RE that we observed in both type of adipose tissues of ob/ob mice (Fig.2A and 2B). Fat deposits of RE can be used as a reserve for body vitamin A homeostasis, if the liver RE stores are reduced (O'Byrne SM et al. 2005). In the present study, we found that the liver RE stores were depleted in ob/ob mice (Fig.2D). Some direct uptake of circulating RE by peripheral tissues (Fig.6A), other esterification enzymes (ARAT) and vitamin A delivery from the liver to the circulation also influence the turnover and the amount of RE stores in tissues (Orland et al. 2005).

RDH10. The cytosolic pool of ROL in adipocytes is supplied by the circulating ROL-RBP4 complex and by enzymatic hydrolysis of local RE stores. RA treatment normalized the RDH10 expression in SF and LIV and increased its expression in VF tissues (Fig.1). This oxidoreducing enzyme from the RDH/SDR family is critical given that it is 98.6% conserved at the amino-acid level between mice and humans (Wu B. X. et al. 2002). Like other RDHs, RDH10 oxidizes (NAD⁺ to NADH) ROL to retinaldehyde (RAL) or reduces (NADPH to NADP⁺) RAL to ROL (Parés et al. 2008). In addition to vision and embryogenesis, RDH10 is important in energy metabolism, as it is associated with mitochondrial membranes and/or lipid droplets (Jiang and Napoli 2013). The RDH10 is specific for at-ROL (Parés et al. 2008). RDH10 should therefore influence, at least in part, the fat tissue at-ROL pool; in the present study, RA treatment normalized the ROL pool in SF and VF tissues compared to that of lean control mice (Fig.2A and 2B).

RALDHs. These enzymes catalyse the production of endogenous RA in target tissues, including fat (Reichert et al. 2011). In figure 1, both RALDH1 and RALDH2 enzymes expressions (mRNA) are increased in VF and LIV compared to lean controls. On the other hand, both enzymes expression are decreased in SM and finally RALDH1 expression is increased and RALDH2 is decreased in SF compared to lean controls. RA treatment normalized RALDH2 in VF only. It further increased both enzymes in LIV and RALDH1 in VF. RA treatment improved but did not normalized RALDH1 in SF and SM and RALDH2 in SF but had no effect on RALDH2 in SM (Fig.1). Other groups have also reported specific differences in the RALDH transcripts levels, with higher expression (mRNA) of RALDH1 in VF pre-adipocytes than in SF pre-adipocytes of C57BL/6 mice (Gesta et al. 2006); however this has not been confirmed at the protein level (Peinado et al. 2010). Furthermore, in mature murin adipose tissue, it appears that there is a higher level of RALDH1 at the protein level in SF than in VF of C57BL/6 mice (Sima et al. 2011). In humans, other groups have observed an up-regulation of RALDH2 levels in the stromal-vascular fraction (SVF) of VF at both the mRNA and protein levels (Peinado et al. 2010). Thus, it is possible that in certain circumstances, VF pre-adipocytes may produce higher levels of endogenous RA than SF pre-adipocytes (Peinado et al. 2010) that differentially interact with RA treatment than for adipogenesis (Bonet et al. 2003). Inverse correlations between transcripts and protein levels suggest additional posttranslational regulation of the protein, as is the case for STRA6 (Muenzner et al. 2013). Interestingly, in lean C57/BL6 mice (routine background strain to create transgenic ob/ob mice) treated with RA, higher expressions of RALDH2 were found to be associated with normal liver regeneration (Liu et al. 2014). Moreover, it was found that a different RA treatment reduced RALDH1 transcripts levels and resulted in a lack of adipocyte formation and lower fat accumulation in C57BL/6 mice (Reichert et al. 2011, Ziouzenkova O et al. 2007a). In our study a similar phenomenon may contribute, at least in part, to the decreased adipocyte sizes found in the SF of RA treated ob/ob mice (Fig.5).

CRABPs. In the present study, RA treatment improved the abnormal gene expressions (mRNA) of the cellular retinoic acid binding protein 1 (CRABP1) transporter in all tissues (SF, VF, SM and LIV) of ob/ob mice compared to lean controls. RA treatment normalized the mRNA expression of CRABP2 in liver only, had no effect in SF and SM, but further increased the expression in VF (Fig. 1). Under RA stimulation, CRABP2 is known to decrease obesity by inhibiting pre-adipocyte differentiation (Berry et al. 2012b, Berry and Noy 2009, Berry et al.

2010). This is consistent with the reduced size of adipocytes observed in the VF of RA treated *ob/ob* mice (Manolescu et al. 2014). The main role of the CRABP1 and the CRABP2 is to translocate the RA into the nucleus, where it activates the RA nuclear receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs) (Chambon P 2005). The fine tuning of the RA concentrations entering the nucleus by CRABP1 and CRABP2 prevents teratogenic effects of excessive RA (Maden M. et al. 1988). The CRABP1 and CRABP2 also guide RA for catabolism (Boylan J. F. and Gudas 1992b, Stachurska et al. 2011) in the cytochromes CYP26A1 and B1 (Giguère 1994, Napoli JL et al. 1991) and secondary in mitochondria (Ruff and Ong 2000).

CYP26s. The RA treatment significantly increased the expression of catabolic enzymes CYP26A1 in SF, SM and LIV and the CYP26B1 in VF, SM and LIV (Fig.1) suggesting oxidation of excess RA into polar metabolites for elimination in the urine (Frolik et al. 1979).

RARs; RXRs. The RA treatment in *ob/ob* mice increased the RAR receptor expression in SF while it decreased that of the RXR receptor in both SF and VF (Fig.1). These high-RAR and low-RXR expression profiles have been reported to inhibit adipogenesis and pre-adipocyte differentiation and to reduce adult adipocyte differentiation, contributing to decreased fat deposits (Berry et al.2012b, Berry and Noy 2009, Berry et al. 2010, Ziouzenkova O. et al. 2007b). This is consistent with our present observations showing that RA treatment resulted in a significant reduction in the adipocyte sizes in SF and VF tissues (Fig.5).

RA normalizes vitamin A concentrations in tissues, improving its homeostasis

In the *ob/ob* mice, vitamin A reserves (RE) were found to be reduced in liver (Fig.2D) while both ROL and RE forms were found to be increased in SF, VF and SM tissues compared to lean control mice (Fig.2A, 2B, 2C). These higher concentrations of vitamin A in SF, VF and SM tissues of *ob/ob* mice compared to lean mice, suggest an increased uptake of circulating vitamin A and/or a lower intra-tissue metabolism (Fig.6A). We observed lower concentrations of RE in the LIVs of *ob/ob* mice compared to lean mice, which suggests enhanced hydrolysis is required to supply increased ROL-RBP4 output from the liver for ROL transport. This would be consistent with the increased serum RBP4 and ROL concentrations observed in obesity and insulin resistance conditions (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005). Several studies in rodents and humans have reported lower vitamin A metabolism in diabetic conditions (Rhee and Plutzky 2012). In diabetic rats, the metabolic availability of vitamin A is also reduced (Tuitoek et al. 1996). It has been suggested that in conditions associated with insulin resistance,

there is an increased requirement for vitamin A by the peripheral tissues, resulting in the depletion of the vitamin A reserves (RE) in the liver. In one human study, circulating levels of RE were also shown to be elevated in diabetic patients compared to normal subjects (Wako et al. 1986). It is therefore possible that the depleted vitamin A (RE) stores observed in the LIVs of ob/ob mice could also arise from increased direct secretion of RE in addition to increased ROL-RBP4 output for transportation to peripheral tissues. It has been shown that dietary RA reduces circulating ROL concentrations and spares endogenous liver vitamin A (Bhat and Lacroix 1986), inducing a re-accumulation of RE in the liver (Bhat and Lacroix 1986). In the present study, the lack of vitamin A (RE) stores in the livers of ob/ob mice was normalized by the RA treatment. This is likely due to the lower peripheral requirements for vitamin A (being directly provided by the RA treatment), which triggers a decrease in the hepatic output of vitamin A and its RBP transporter into the circulation. This is consistent with the lower serum ROL and RBP4 concentrations we found in the blood of our RA treated ob/ob mice (Manolescu et al. 2010). In the present study, the RA treatment improved vitamin A homeostasis, normalizing ROL levels in SF, VF and SM and retinyl-esters (RE) in SM and LIV tissues while increasing RE in SF and VF.

RA treatment normalizes RBP4 protein concentrations in fat tissues and in the liver

The RBP4 protein concentrations in SF, VF and LIV tissues of ob/ob mice were found to be decreased compared to healthy lean mice (Fig.3). As suggested above, this could be due to increased ROL-RBP4 output from the liver for ROL transport in the blood, but could also be due to increased release of the RBP4 adipokine from the SF and VF in ob/ob mice; all of these sources contribute to the elevated serum RBP4 concentrations found in obesity and diabetic conditions (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005). RA treatment increased RBP4 protein to near normal concentrations in SF, VF and LIV tissues (Fig.3A, 3B and 3C). This could be due to decreased ROL-RBP4 output from the liver for ROL transport in the blood, but could also be due to a decreased release of the RBP4 adipokine from the SF and VF in ob/ob mice treated with RA. This is consistent with previous findings from our laboratory, where RA treatment in ob/ob mice diminished circulating ROL and RBP4 levels and improved insulin sensitivity (Manolescu et al. 2010). Furthermore, RA treatment lowered RBP4 (mRNA) expression in fat tissues (Fig.1A and B) suggesting that the decreased serum RBP4 concentrations in ob/ob mice

blood, in response to RA treatment, could be partially due to decreased synthesis and secretion of the adipokine RBP4 from fat tissues (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005).

RA reduces adipocyte hypertrophy in the context of body weight reduction

Previous studies from our laboratory in ob/ob mice have shown that RA treatment was associated with a reduction in body weight (Manolescu et al. 2010) involving a reduction in visceral fat adipocyte diameter (Manolescu et al. 2014). In the present study, RA treatment was also associated with a significant reduction in the SF and VF adipocyte sizes (Fig.5A;B), contributing, at least in part, to the previously noted body weight loss (Manolescu et al. 2010). Decreased adipocyte size likely contributes to improve peripheral insulin sensitivity as well (Lundgren et al. 2007). It has been reported that the weight loss associated with RA treatment in obese rodents results from RA-specific effects in depleting lipid stores (e.g., low adipogenesis, high-lipolysis, increased metabolism) and not from loss of appetite or through toxic effects (Bonet et al. 2012). This is consistent with our results of several expression profiles (mRNA) that we found in SF and VF tissues (Fig. 1 A and B) for a number of genes involved in vitamin A metabolism (e.g., CRBP, RALDH, CRABP, RAR, RXR) which were also reported to inhibit adipogenesis, adipocyte differentiation and fat accumulation (Frey and Vogel 2011). The anti-obesity effect of RA is mediated by specific nuclear receptors (RAR, RXR) and heterodimers (RAR-RXR, RXR-PPAR, RXR-TR, HNF4a), with other molecules participating in energy metabolism (Berry and Noy 2009, Frey and Vogel 2011). Several authors have reported that RA has the capacity to increase energy expenditure (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). In our study, animals remained lethargic and had similar locomotor reflex activity between RA treated and non-treated groups. On the other hand, the reduction in body weight, fat and in adipocyte size that we observed, despite a similar food intake (measured daily) in RA treated and untreated animals (Manolescu et al. 2010), suggests an improvement in the energy metabolism of RA treated animals, consistent with parallel findings but with different animals, higher RA doses and different treatment methods (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). Our goal here was not to precisely quantify daily energy expenditures from kinetic or basal metabolism in these proven lethargic mice, but to assess specific metabolic phenotypes and anatomic outcomes, like the reductions in IR, body weight and adipocyte sizes. These effects occurred without affecting the animal's food intake or

locomotor reflex, while using a small oral dose of RA for a short period of time (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010).

RA influences two key genes for mitochondrial biogenesis and the beige/brown fat

Given that RA is known to directly modulate uncoupling protein 1 (UCP1) expression via the RA responsive element (RARE) found on the promoter of the UCP1 gene (Alvarez et al. 1995, Brun et al. 2013, Larose et al. 1996, Mercader et al. 2010), we investigated the expressions of UCP1 and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α), which is a known transcriptional co-activator and a central inducer of mitochondrial biogenesis (Austin and St-Pierre 2012). We found that both PGC-1 α and UCP1 expression levels (mRNA) were significantly increased with RA treatment (Fig.4A; B). This is consistent with parallel reports where RA was shown to stimulate the expression of these two genes in rodent white fat (Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). PGC-1 α and UCP1 are two proteins known to be involved in mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation, thermogenesis and energy expenditure in beige/brown fat tissues (Chen H. Y. et al. 2013). The RA activation of RAR and RXR has been reported to influence PGC1 α and UCP1 gene expression (Brun et al. 2013, Villarroya et al. 2004). In the present study, RA lowered RALDH1 expression in the SF (Fig.1). Interestingly, lowered RALDH1 levels have been shown to be associated with the induction of beige/brown fat islets in white adipose tissue (Frey and Vogel 2011, Kiefer et al. 2012). Indeed, lowering RALDH1 increases cellular retinal (RAL), which has been reported to induce the expression of UCP1 mRNA in white adipose tissue through the activation of RAR (Frey and Vogel 2011, Kiefer et al. 2012). RA modulates adipocyte maturation, and the expression of the RA cellular transporter CRABP2 was found to be repressed during adipocyte differentiation (Berry et al. 2010). The ability of RA to reduce or delay mouse pre-adipocyte differentiation has also been shown (Dimaculangan et al. 1994), but only in early stages and under high RAR expression conditions (Xue et al. 1996). The UCP1 expression is recognized to be a specific molecular signature for brown adipose tissue (BAT) (Chen H. Y. et al. 2013). The beige fat tissue (sometimes called «brite») present in mice and in humans, can also express PGC1 α and UCP1 under various conditions, including RA treatment (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Lidell et al. 2013, Lidell et al. 2014, Mercader et al. 2006, Wu J. et al. 2012).

RA modulates adipose tissue morphology, suggesting beige/brown fat characteristics

Our histological investigation found, in both SF and VF tissues (Fig.5A;B and Fig. 6B) of RA treated animals, an increased number of small and rather polygonal adipocytes, with variable morphology, which are reported histological features for brown fat (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006, van Marken Lichtenbelt et al. 2009, Wijers et al. 2009). We have also noticed increased PUFAs presence in the adipose tissue of RA-treated mice, suggesting that RA may stimulate BAT genesis due to typical dominance of PUFAs in beige/brown fat. Needing more oxygen, the brown fat tissue is also more vascularised (with blood and lymphatic vessels) than the white fat (Kuroshima 1993). Our histology slides, also revealed several incipient light signs suggesting vascular angiogenesis in SF and VF tissues (Fig.5 A;B and Fig.6 B) of RA treated animals. Perhaps a longer period and/or higher dose of RA would have strengthened this vascular phenotype and immuno-fluorescence could be performed to confirm it. We also analysed our histology slides in inverted light, for higher contrast purposes. Our observations of adipocyte morphology and histology- under haematoxylin-eosin staining- are in line with studies that have specifically demonstrated the capacity of RA to promote « beige fat » (Bonet et al. 2012) or the remodelling of white fat with the acquisition of brown adipose-like properties and morphology (Bonet et al. 2013, Mercader et al. 2006). Low doses of all-*trans* RA are positive effectors of pre-adipocytes differentiation in mice (Safonova et al. 1994a, Safonova et al. 1994b). Other molecules (e.g., PPAR ligands, lipolysis derived fatty-acids, BNP) were also reported to promote brown-beige fat acquisition in white adipose tissue, but most of these molecules depend on dimers of their specific nuclear receptors with RXR, therefore needing RA to activate the RXR component of the dimers (Brun et al. 2013, Villarroya et al. 1999, Villarroya et al. 2004). ANP and BNP have been described as cardiac hormones inducing brown fat (Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012). In our experiments, the RA treatment in ob/ob mice increased the mRNA expression levels of both ANP and BNP in cardiomyocytes (Manolescu et al. 2014). Furthermore, mice over-expressing BNP have been shown to have lower body fat and increased lipolysis (Miyashita et al. 2009). Cold exposure induces sympathetic stimulation of brown and white fat via norepinephrine binding to beta-adrenergic receptors and promotion of hydrolysis of triglycerides to free fatty acids and glycerol (Kuroshima 1993). In brown adipocytes, the fatty acids are quickly oxidized under the influence of the UCP1 protein, producing heat rather than ATP, since no exercise is needed. This is part

of a process called non-shivering thermo-genesis (Kuroshima 1993). Beta-adrenergic signalling is also active in diet-induced thermo-genesis (Bachman et al. 2002). Arctic mammals have higher brown fat mass and thermogenesis as adaptations to cold environments. Interestingly, they seasonally modulate their appetite through leptin levels variations, they get fat with no diabetes in the fall and slim with no motor activity in winter, and are the animals that accumulate the most vitamin A in their livers (Senoo et al. 2012). These are highly intriguing syllogisms, pointing to a potential vitamin A contribution in hibernating mammals energy homeostasis. The vitamin A derivative RA is recognized for its involvement in cell maturation and differentiation and may guide pre-adipocytes to become brown/beige instead of white (Mercader et al. 2006). When activated (e.g., cold exposure), brown/beige fat contribute to overall metabolism (Bonet et al. 2013, Mercader et al. 2006). In this first study performed with very low oral doses of RA, we did not exposed our ob/ob mice to cold to maximally stimulate the brown fat, but physiologic alimentary thermogenesis probably contributed. However, in other rodents, it has been demonstrated that higher doses of RA can induce BAT and increase oxidative metabolism in mature adipocytes, even at room temperature (Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2007, Mercader et al. 2006).

RA treatment may influence autophagy activity in fat tissues

In the present study, we found a lower presence of several histologic structures recalling autophagy granules in fat tissues, suggesting reduced autophagy in hypertrophic adipocytes from SF and VF tissues of ob/ob mice, compared to healthy lean mice (Fig.6B). The RA treatment increased these autophagy-like granule agglomerations in SF and VF tissues of ob/ob+RA mice (Fig.6B) while reducing adipocyte hypertrophy (Fig.5A;B), body weight and insulin resistance (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010). Thus, RA treatment may also have a beneficial influence in improving autophagy activity compared to the lean animal profile, in ob/ob mice fat tissues. Autophagy is an intracellular lysosomal catabolic process, evolutionarily preserved for recycling damaged organelles (constitutive) or to mobilize intracellular nutrients for energy needs (adaptive) in cases of low food availability (Kim K. H. and Lee 2014). Autophagy is also involved in cellular and body energy homeostasis. In fat tissues, triglycerides from lipid droplets can be disrupted by cytosolic lipases hydrolysis or by lysosomal lipases through an autophagy process called «lipophagy» (Singh et al. 2009, Skop et al. 2012). Three forms of autophagy have been described to date: macro-autophagy, micro-

autophagy and chaperone-mediated autophagy, which are considered to complement one-another (Kim K. H. and Lee 2014). RA can promote auto-phagosome maturation and influence macro-autophagy by mechanisms independent of RA nuclear receptors (Rajawat et al. 2010). RA can also stimulate chaperone-mediated autophagy (CMA) by activating the RAR nuclear receptors (Anguiano et al. 2013). Increased obesity is reported to induce various autophagy deregulations associated with inflammatory conditions and metabolic disorders, such as insulin resistance and diabetes (Kim K. H. and Lee 2014, Koga et al. 2010, Stienstra et al. 2014). The underlying mechanisms are not fully understood. In humans, obesity and diabetes were mostly found to be associated with enhanced autophagy (Jansen et al. 2012, Kovsan et al. 2011). However, in rodent fat, autophagy has been found to be reduced both in obese and IR rodents fed with a high-fat diet (HFD) and to be associated with inflammation and hypertrophic adipocytes (Yoshizaki et al. 2012). In the context of increasing evidence from the literature, our present observations support a potential role for retinoids in obesity and diabetes management, given their impact on adipogenesis, lipolysis, fat remodelling and energy metabolism (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). In Fig.6 we provide an overall scheme of retinoid metabolism (A) and suggest several of the potential RA-mediated effects on adipocyte remodelling (B), based on our work and the current literature.

Limitations

Our laboratory has demonstrated that RA treatment in obese and insulin-resistant ob/ob mice decreases visceral adipocyte size (Manolescu et al. 2014), serum ROL and RBP4 levels, fasting blood glucose concentrations, insulin resistance and body weight, despite similar isocaloric food intake in treated and non-treated animals (Manolescu et al. 2010), suggesting overall improvement in energy metabolism. In the present study decreased subcutaneous and visceral adipocyte diameters were consistent with our previous findings. However, we have not measured the exact energy expenditure (e.g., basal metabolism, thermogenesis, pilomotor, autophagy or total kinetic activity) to assess the origins and precise daily contributions to body weight loss and adipocyte reduction. Nevertheless, our study presents valid anatomic- metabolic data and are supported by parallel reports (Berry and Noy 2009, Mercader et al. 2008, Mercader et al. 2006, Ribot et al. 2001) that retinoid (in form of higher RA doses) reduces body fat and insulin resistance in other models of obese rodents, stimulates mitochondrial activity, systemically enhances whole-body energy expenditures and depletes fat deposits (Bonet et al.

2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). In the present study, we found that a low dose of RA increased the expression (mRNA) of 2 key genes (PGC1 α and UCP1) already known to participate in mitochondrial biogenesis (Austin and St-Pierre 2012) and energy metabolism (Chen H. Y. et al. 2013) in beige/brown fat. We also discussed several other genes (mRNA) reported to be potentially involved in the conversion of white to brown fat such as: natriuretic peptides (Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012), BNP (Manolescu et al. 2014) and several genes involved in retinoid metabolism (e.g., CRBP, RALDH, CRABP, RAR, and RXR) reported to be favourable to PGC1 α and UCP1 expression in beige/brown fat tissue (Frey and Vogel 2011, Kiefer et al. 2012). However, in order to fully characterize the intensity and functionality of beige/brown tissue induced by RA, UCPs and additional mitochondrial proteins should be investigated (qRT-PCR, WB) as well as other markers of « beiging » fat (e.g., FGF21, CIDEA and PRDM16). In parallel with our experiments and other animal models, there is increasing evidence that higher doses of RA trigger an up-regulation (mRNA) of PGC1 α , UCP1 and other genes expression (e.g., PPAR γ , COX-II, CPT1) involved in beige/brown fat induction (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013, Mercader et al. 2006). In our histology slides, we also identified several incipient light signs recalling vascular angiogenesis in SF and VF tissues (Fig.5 A;B and Fig.6 B) of RA treated animals, and many little and polygonal shaped adipocytes morphology, reported as histological features for brown fat (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006, van Marken Lichtenbelt et al. 2009). We have imaged our histology slides in inverted light for higher contrast and better visualization. Immune-fluorescence analysis of tissue sections would help to draw more definite conclusions. The literature shows haematoxylin-eosin morphologic staining patterns between WAT and BAT similar with ours, for discrimination between WAT and BAT (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006). Remodelling is still under investigation in white and brown adipocytes (Lee and Cowan 2014) regarding whether beige/brown adipocytes may differentiate only from specific brown pre-adipocyte adipoblasts, from myoblasts (Saely et al. 2012) or can also trans-differentiate from mature white adipocytes (Rosen and MacDougald 2006). As such, our study does not provide exhaustive answers. Beyond our present study goals, we only noticed several possible autophagy-appearing granule agglomeration variations in lean, ob/ob and ob/ob+RA mouse fat. Further investigation of mammalian autophagy rates in BAT versus WAT, using immunofluorescence, autophagy flux by confocal microscopy (Stienstra et al. 2014), Atg7

(critical macro-autophagy gene autophagy-related 7) expression analysis (Yoshizaki et al. 2012) and more chaperone-modulated autophagy (CMA) studies (Anguiano et al. 2013) with retinoid (Rajawat et al. 2010) or cold (Martinez-Lopez et al. 2016) exposures, would be highly warranted.

Conclusions

We have previously shown the ob/ob mouse, a leptin deficient model characterized by severe obesity with adipocyte hypertrophy, insulin resistance and dysglycaemia, which are features comparable to that of human type 2 diabetes (Mazumder et al. 2004), also has impaired vitamin A metabolism characterized by increased vitamin A and RBP4 concentrations in the circulation (Manolescu et al. 2010). Our study shows for the first time, to our knowledge, that ob/ob mice with impaired vitamin A metabolism, are further characterized by decreased vitamin A stores in the liver, increased vitamin A concentrations in adipocytes (SF and VF), and decreased RBP4 protein concentrations in the liver and the adipocytes. We also show for the first time that a low dose of RA (2µg/gbw/day), delivered orally for a short period of time (16 days) in ob/ob mice, modulates in a tissue specific manner the expression of retinoid metabolism-related genes and normalizes vitamin A concentrations in adipose tissues, skeletal muscle and liver, leading to an improved vitamin A homeostasis. Our RA treatment also normalized the RBP4 protein concentrations in adipose tissues and liver, decreased adipocyte hypertrophy in SF and VF tissues and increased several histologic structures suggestive of angiogenesis and autophagy granule agglomerations. The reduced adipocyte sizes and body weight fat, despite similar food intake and locomotor reflexes in RA treated and untreated mice, suggest an improvement in energy metabolism. Increased PGC1α and UCP1 expression (mRNA) and specific morphological changes in fat tissues suggest the presence of beige/brown fat. The histological morphologic structures recalling angiogenesis and autophagy granules in fat tissues are physiologic observations suggesting improved metabolic activity in these tissues. We demonstrate that metabolic improvements are possible out of pathways strictly controlled by leptin and sexual hormones, which are dysfunctional in obese-diabetic patients and respectively decreased in elderly individuals (e.g. menopause). This is highly appealing for beneficial effects, in conjunctions with a RA treatment, when these hormones are partially functional in affected patients. These findings may serve in future human studies aiming for new therapeutic strategies for obesity, IR and type 2 diabetes.

Acknowledgments: The authors thank Dr. Pangala V. Bhat for his expert retinoid advice, Dr. Bogdan A Danalache for performing the tissue morphology microscopy, Dr. Donghao Wang for his genomic expertise, coaching and supervising the RT-qPCR techniques, calculations and statistics, Dr. Yolanta Gutkowska and Dr. Jacques Turgeon for their kind permissions to use their lab facilities and Dr. Bénédicte Fontaine-Bisson for her English language revisions.

Support: This work was supported by the Canadian Institute of Health Research CIHR/IRSC and CRCHUM. Manolescu, D.-C is a fellow of Québec FRQS (2012; 2013) PhD Scholarship, Silver Award Medallist of the Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Aurelia Sima is fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement Scholarship 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015.

Conflict of interest statement and disclosures: Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Aurelia**Sima**¹, Sylvie **Mader**²and Jean-Louis **Chiasson**¹, and the acknowledged, have no conflicts of interest regarding this manuscript.

REFERENCES

- Alemán, G., Torres, N., and Tovar, A.R. 2004. [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development]. *Rev Invest Clin.* **56**(3): 351-367.
- Alvarez, R., de Andrés, J., Yubero, P., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. 1995. A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem.* **270**(10): 5666-5673.
- Anguiano, J., Garner, T.P., Mahalingam, M., Das, B.C., Gavathiotis, E., and Cuervo, A.M. 2013. Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives. *Nat Chem Biol.* **9**(6): 374-382.
- Austin, S. and St-Pierre, J. 2012. PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci.* **125**(Pt 21): 4963-4971.
- Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., and Lowell, B.B. 2002. betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science.* **297**(5582): 843-845.
- Bastard, J.P., Jardel, C., Bruckert, E., Vidal, H., and Hainque, B. 2000a. Variations in plasma soluble tumour necrosis factor receptors after diet-induced weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab.* **2**(5): 323-325.
- Bastard, J.P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H., and Hainque, B. 2000b. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* **85**(9): 3338-3342.
- Berry, D.C. and Noy, N. 2009. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol.* **29**(12): 3286-3296.
- Berry, D.C. and Noy, N. 2012. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* **1821**(1): 168-176.
- Berry, D.C., Soltanian, H., and Noy, N. 2010. Repression of cellular retinoic acid-binding protein II during adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* **285**(20): 15324-15332.
- Berry, D.C., Jin, H., Majumdar, A., and Noy, N. 2011. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(11): 4340-4345.
- Berry, D.C., O'Byrne, S.M., Vreeland, A.C., Blaner, W.S., and Noy, N. 2012a. Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol.* **32**(15): 3164-3175.
- Berry, D.C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C.M., and Noy, N. 2012b. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes.* **61**(5): 1112-1121.
- Bhat, P. and Lacroix, A. 1986. Separation of geometric isomers of retinol and retinoic acid in nonaqueous high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **123**(75-85).

- Bhat, P.V. and Lacroix, A. 1983. Separation and estimation of retinyl fatty acyl esters in tissues of normal rat by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* **272**(2): 269-278.
- Blaner, W. 2007. STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab.* **5**(3): 164-166.
- Blaner, W., O'Byrne, S., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D., Jiang, H., Schwabe, R., Hillman, E., Piantedosi, R., and Libien, J. 2009. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta.* **1791**(6): 467-473.
- Blaner, W.S. 1989. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev.* **10**(3): 308-316.
- Blomhoff, R. and Blomhoff, H. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* **66**(7): 606-630.
- Blomhoff, R., Green, M., Green, J., Berg, T., and Norum, K. 1991. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev.* **71**(4): 951-990.
- Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* **1821**(1): 177-189.
- Bonet, M.L., Oliver, P., and Palou, A. 2013. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* **1831**(5): 969-985.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., and Palou, A. 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci.* **60**(7): 1311-1321.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* **122**(3): 1022-1036.
- Bouillet, P., Sapin, V., Chazaud, C., Messaddeq, N., Décimo, D., Dollé, P., and Chambon, P. 1997. Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev.* **63**(2): 173-186.
- Boylan, J.F. and Gudas, L.J. 1992. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem.* **267**(30): 21486-21491.
- Brun, P.J., Yang, K.J., Lee, S.A., Yuen, J.J., and Blaner, W.S. 2013. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors.* **39**(2): 151-163.
- Casteilla, L., Pénicaud, L., Cousin, B., and Calise, D. 2008. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity. *Methods Mol Biol.* **456**(23-38).
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**(9): 940-954.
- Chambon, P. 2005. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol.* **19**(6): 1418-1428.
- Chen, H.Y., Liu, Q., Salter, A.M., and Lomax, M.A. 2013. Synergism between cAMP and PPAR γ Signalling in the Initiation of UCP1 Gene Expression in HIB1B Brown Adipocytes. *PPAR Res.* **2013**(476049).
- Christou, G.A., Tellis, C.C., Elisaf, M.S., Tselepis, A.D., and Kiortsis, D.N. 2012. The changes in plasma retinol-binding protein 4 levels are associated with those of the apolipoprotein B-containing lipoproteins during dietary and drug treatment. *Angiology.* **63**(1): 67-75.
- Clagett-Dame, M. and DeLuca, H.F. 2002. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr.* **22**(347-381).

- Cooper, A.D. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res.* **38**(11): 2173-2192.
- Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., Huang, T.L., Roberts-Toler, C., Weiner, L.S., Sze, C., Chacko, A.T., Deschamps, L.N., Herder, L.M., Truchan, N., Glasgow, A.L., Holman, A.R., Gavrilu, A., Hasselgren, P.O., Mori, M.A., Molla, M., and Tseng, Y.H. 2013. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med.* **19**(5): 635-639.
- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., and Blaner, W.S. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients.* **3**(1): 63-103.
- Dimaculangan, D.D., Chawla, A., Boak, A., Kagan, H.M., and Lazar, M.A. 1994. Retinoic acid prevents downregulation of ras resection gene/lysyl oxidase early in adipocyte differentiation. *Differentiation.* **58**(1): 47-52.
- Drel, V.R., Mashtalir, N., Ilnytska, O., Shin, J., Li, F., Lyzogubov, V.V., and Obrosova, I.G. 2006. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes.* **55**(12): 3335-3343.
- Frey, S.K. and Vogel, S. 2011. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients.* **3**(1): 27-39.
- Frolik, C.A., Roberts, A.B., Tavela, T.E., Roller, P.P., Newton, D.L., and Sporn, M.B. 1979. Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxoretinoic acid. In vitro metabolites of all-trans-retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry.* **18**(10): 2092-2097.
- Gesta, S., Blüher, M., Yamamoto, Y., Norris, A.W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C., and Kahn, C.R. 2006. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(17): 6676-6681.
- Giguère, V. 1994. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev.* **15**(1): 61-79.
- Goodman, D., Blomstrand, R., Werner, B., Huang, H., and Shiratori, T. 1966. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *J Clin Invest.* **45**(10): 1615-1623.
- Goodman, D.S. 1974. Vitamin A transport and retinol-binding protein metabolism. *Vitam Horm.* **32**(167-180).
- Graham, T., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T., Henry, R., Wason, C., Oberbach, A., Jansson, P., Smith, U., and Kahn, B. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med.* **354**(24): 2552-2563.
- Gutkowska, J., Paquette, A., Wang, D., Lavoie, J.M., and Jankowski, M. 2007. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **293**(1): R267-275.
- Hatcher, J.P., Jones, D.N., Rogers, D.C., Hatcher, P.D., Reavill, C., Hagan, J.J., and Hunter, A.J. 2001. Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res.* **125**(1-2): 43-47.
- Hussain, M.M., Maxfield, F.R., Más-Oliva, J., Tabas, I., Ji, Z.S., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem.* **266**(21): 13936-13940.
- Isken, A., Golczak, M., Oberhauser, V., Hunzelmann, S., Driever, W., Imanishi, Y., Palczewski, K., and von Lintig, J. 2008. RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab.* **7**(3): 258-268.

- Jansen, H.J., van Essen, P., Koenen, T., Joosten, L.A., Netea, M.G., Tack, C.J., and Stienstra, R. 2012. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology*. **153**(12): 5866-5874.
- Kahn, B.B. and Flier, J.S. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. **106**(4): 473-481.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*. **315**(5813): 820-825.
- Kelly, K.R., Kashyap, S.R., O'Leary, V.B., Major, J., Schauer, P.R., and Kirwan, J.P. 2010. Retinol-binding protein 4 (RBP4) protein expression is increased in omental adipose tissue of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. **18**(4): 663-666.
- Kiefer, F.W., Vernochet, C., O'Brien, P., Spoerl, S., Brown, J.D., Nallamshetty, S., Zeyda, M., Stulnig, T.M., Cohen, D.E., Kahn, C.R., and Plutzky, J. 2012. Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med*. **18**(6): 918-925.
- Kim, K.H. and Lee, M.S. 2014. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. **10**(6): 322-337.
- Klaus, S., Münzberg, H., Trüloff, C., and Heldmaier, G. 1998. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am J Physiol*. **274**(2 Pt 2): R287-293.
- Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. 2010. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J*. **24**(8): 3052-3065.
- Kovsan, J., Blüher, M., Tarnowski, T., Klötting, N., Kirshtein, B., Madar, L., Shai, I., Golan, R., Harman-Boehm, I., Schön, M.R., Greenberg, A.S., Elazar, Z., Bashan, N., and Rudich, A. 2011. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. **96**(2): E268-277.
- Kuroshima, A. 1993. Brown adipose tissue thermogenesis as physiological strategy for adaptation. *Jpn J Physiol*. **43**(2): 117-139.
- Landrier, J.F., Marcotorchino, J., and Tourniaire, F. 2012. Lipophilic micronutrients and adipose tissue biology. *Nutrients*. **4**(11): 1622-1649.
- Landsberg, L., Young, J.B., Leonard, W.R., Linsenmeier, R.A., and Turek, F.W. 2009. Do the obese have lower body temperatures? A new look at a forgotten variable in energy balance. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. **120**(287-295).
- Larose, M., Cassard-Doulcier, A.M., Fleury, C., Serra, F., Champigny, O., Bouillaud, F., and Ricquier, D. 1996. Essential cis-acting elements in rat uncoupling protein gene are in an enhancer containing a complex retinoic acid response domain. *J Biol Chem*. **271**(49): 31533-31542.
- Lee, P., Smith, S., Linderman, J., Courville, A.B., Brychta, R.J., Dieckmann, W., Werner, C.D., Chen, K.Y., and Celi, F.S. 2014. Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. **63**(11): 3686-3698.
- Lee, Y.K. and Cowan, C.A. 2014. Differentiation of white and brown adipocytes from human pluripotent stem cells. *Methods Enzymol*. **538**(35-47).
- Li, Y., Wongsiriroj, N., and Blaner, W.S. 2014. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr*. **3**(3): 126-139.
- Lidell, M.E., Betz, M.J., and Enerbäck, S. 2014. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*. **3**(1): 63-66.

- Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., Virtanen, K.A., Beuschlein, F., Persson, A., Borga, M., and Enerbäck, S. 2013. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* **19**(5): 631-634.
- Liu, H.X., Ly, I., Hu, Y., and Wan, Y.J. 2014. Retinoic acid regulates cell cycle genes and accelerates normal mouse liver regeneration. *Biochem Pharmacol.* **91**(2): 256-265.
- Lundgren, M., Svensson, M., Lindmark, S., Renstrom, F., Ruge, T., and Eriksson, J.W. 2007. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia.* **50**(3): 625-633.
- MacDonald, P.N. and Ong, D.E. 1988. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J Biol Chem.* **263**(25): 12478-12482.
- Maden, M., Ong, D.E., Summerbell, D., and Chytil, F. 1988. Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud. *Nature.* **335**(6192): 733-735.
- Manolescu, D.C., Sima, A., and Bhat, P.V. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr.* **140**(2): 311-316.
- Manolescu, D.C., Jankowski, M., Danalache, B.A., Wang, D., Broderick, T.L., Chiasson, J.L., and Gutkowska, J. 2014. All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* **39**(10): 1127-1136.
- Marwarha, G., Berry, D.C., Croniger, C.M., and Noy, N. 2014. The retinol esterifying enzyme LRAT supports cell signaling by retinol-binding protein and its receptor STRA6. *FASEB J.* **28**(1): 26-34.
- Matt, N., Schmidt, C.K., Dupé, V., Dennefeld, C., Nau, H., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. 2005. Contribution of cellular retinol-binding protein type 1 to retinol metabolism during mouse development. *Dev Dyn.* **233**(1): 167-176.
- Mercader, J., Palou, A., and Bonet, M. 2010. Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity (Silver Spring).* **18**(4): 655-662.
- Mercader, J., Granados, N., Bonet, M.L., and Palou, A. 2008. All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem.* **22**(1-4): 363-372.
- Mercader, J., Madsen, L., Felipe, F., Palou, A., Kristiansen, K., and Bonet, M.L. 2007. All-trans retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes. *Cell Physiol Biochem.* **20**(6): 1061-1072.
- Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M.L., and Palou, A. 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology.* **147**(11): 5325-5332.
- Miyashita, K., Itoh, H., Tsujimoto, H., Tamura, N., Fukunaga, Y., Sone, M., Yamahara, K., Taura, D., Inuzuka, M., Sonoyama, T., and Nakao, K. 2009. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes.* **58**(12): 2880-2892.
- Moisan, A., Lee, Y.K., Zhang, J.D., Hudak, C.S., Meyer, C.A., Prummer, M., Zoffmann, S., Truong, H.H., Ebeling, M., Kiialainen, A., Gérard, R., Xia, F., Schinzel, R.T., Amrein, K.E., and Cowan, C.A. 2015. White-to-brown metabolic conversion of human adipocytes by JAK inhibition. *Nat Cell Biol.* **17**(1): 57-67.

- Muenzner, M., Tuvia, N., Deutschmann, C., Witte, N., Tolkachov, A., Valai, A., Henze, A., Sander, L.E., Raila, J., and Schupp, M. 2013. Retinol-binding protein 4 and its membrane receptor STRA6 control adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis and retinoic acid receptor α activity. *Mol Cell Biol.* **33**(20): 4068-4082.
- Murholm, M., Isidor, M.S., Basse, A.L., Winther, S., Sørensen, C., Skovgaard-Petersen, J., Nielsen, M.M., Hansen, A.S., Quistorff, B., and Hansen, J.B. 2013. Retinoic acid has different effects on UCP1 expression in mouse and human adipocytes. *BMC Cell Biol.* **14**(41).
- Napoli, J. 1996. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* **10**(9): 993-1001.
- Napoli, J. 2000. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr Rev.* **58**(8): 230-236.
- Napoli, J., Posch, K., Fiorella, P., and Boerman, M. 1991. Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of cellular retinol-binding protein (CRBP) and cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis. *Biomed Pharmacother.* **45**(4-5): 131-143.
- Noy, N. 2000. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J.* **348 Pt 3**(481-495).
- O'Byrne, S., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I., Baehr, W., Palczewski, K., and Blaner, W. 2005. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem.* **280**(42): 35647-35657.
- Orland, M., Anwar, K., Cromley, D., Chu, C., Chen, L., Billheimer, J., Hussain, M., and Cheng, D. 2005. Acyl coenzyme A dependent retinol esterification by acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta.* **1737**(1): 76-82.
- Parés, X., Farrés, J., Kedishvili, N., and Duester, G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci.* **65**(24): 3936-3949.
- Pasutto, F., Sticht, H., Hammersen, G., Gillesen-Kaesbach, G., Fitzpatrick, D.R., Nürnberg, G., Brasch, F., Schirmer-Zimmermann, H., Tolmie, J.L., Chitayat, D., Houge, G., Fernández-Martínez, L., Keating, S., Mortier, G., Hennekam, R.C., von der Wense, A., Slavotinek, A., Meinecke, P., Bitoun, P., Becker, C., Nürnberg, P., Reis, A., and Rauch, A. 2007. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet.* **80**(3): 550-560.
- Peinado, J.R., Jimenez-Gomez, Y., Pulido, M.R., Ortega-Bellido, M., Diaz-Lopez, C., Padillo, F.J., Lopez-Miranda, J., Vazquez-Martínez, R., and Malagón, M.M. 2010. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics.* **10**(18): 3356-3366.
- Quadro, L., Hamberger, L., Colantuoni, V., Gottesman, M., and Blaner, W. 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med.* **24**(6): 421-430.
- Rajawat, Y., Hilioti, Z., and Bossis, I. 2010. Autophagy: a target for retinoic acids. *Autophagy.* **6**(8): 1224-1226.
- Reichert, B., Yasmeen, R., Jeyakumar, S.M., Yang, F., Thomou, T., Alder, H., Duester, G., Maisseyeu, A., Mihai, G., Harrison, E.H., Rajagopalan, S., Kirkland, J.L., and

- Ziouzenkova, O. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol Endocrinol.* **25**(5): 799-809.
- Rhee, E.J. and Plutzky, J. 2012. Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab J.* **36**(3): 167-180.
- Ribot, J., Felipe, F., Bonet, M.L., and Palou, A. 2001. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res.* **9**(8): 500-509.
- Rosen, E.D. and MacDougald, O.A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(12): 885-896.
- Ross, A. 1993a. Overview of retinoid metabolism. *J Nutr.* **123**(2 Suppl): 346-350.
- Ross, A. 1993b. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J.* **7**(2): 317-327.
- Ross, A. and Zolfaghari, R. 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr.* **134**(1): 269S-275S.
- Ross, A., Zolfaghari, R., and Weisz, J. 2001. Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol.* **17**(2): 184-192.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., and De Luca, L.M. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* **80**(3): 1021-1054.
- Ruff, S. and Ong, D. 2000. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria. *FEBS Lett.* **487**(2): 282-286.
- Saely, C.H., Geiger, K., and Drexel, H. 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* **58**(1): 15-23.
- Safonova, I., Reichert, U., Shroot, B., Ailhaud, G., and Grimaldi, P. 1994a. Fatty acids and retinoids act synergistically on adipose cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* **204**(2): 498-504.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., and Shroot, B. 1994b. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* **104**(2): 201-211.
- Samaras, K., Botelho, N.K., Chisholm, D.J., and Lord, R.V. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring).* **18**(5): 884-889.
- Senoo, H., Imai, K., Mezaki, Y., Miura, M., Morii, M., Fujiwara, M., and Blomhoff, R. 2012. Accumulation of vitamin A in the hepatic stellate cell of arctic top predators. *Anat Rec (Hoboken).* **295**(10): 1660-1668.
- Sima, A., Manolescu, D.C., and Bhat, P. 2011. Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues. *Biochem Cell Biol.* **89**(6): 578-584.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* **458**(7242): 1131-1135.
- Skop, V., Cahová, M., Papáčková, Z., Páleníčková, E., Daňková, H., Baranowski, M., Zabielski, P., Zdychová, J., Zídková, J., and Kazdová, L. 2012. Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver. *Physiol Res.* **61**(3): 287-297.
- Stachurska, E., Loboda, A., Niderla-Bielińska, J., Szperl, M., Juszyński, M., Jozkowicz, A., Dulak, J., and Ratajska, A. 2011. Expression of cellular retinoic acid-binding protein I

- and II (CRABP I and II) in embryonic mouse hearts treated with retinoic acid. *Acta Biochim Pol.* **58**(1): 19-29.
- Stienstra, R., Haim, Y., Riahi, Y., Netea, M., Rudich, A., and Leibowitz, G. 2014. Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes. *Diabetologia.* **57**(8): 1505-1516.
- Szeto, W., Jiang, W., Tice, D.A., Rubinfeld, B., Hollingshead, P.G., Fong, S.E., Dugger, D.L., Pham, T., Yansura, D.G., Wong, T.A., Grimaldi, J.C., Corpuz, R.T., Singh, J.S., Frantz, G.D., Devaux, B., Crowley, C.W., Schwall, R.H., Eberhard, D.A., Rastelli, L., Polakis, P., and Pennica, D. 2001. Overexpression of the retinoic acid-responsive gene *Stra6* in human cancers and its synergistic induction by Wnt-1 and retinoic acid. *Cancer Res.* **61**(10): 4197-4205.
- Tsutsumi, C., Okuno, M., Tannous, L., Piantedosi, R., Allan, M., Goodman, D.S., and Blaner, W.S. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem.* **267**(3): 1805-1810.
- Tuitoek, P.J., Lakey, J.R., Rajotte, R.V., and Basu, T.K. 1996. Strain variation in vitamin A (retinol) status of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res.* **66**(2): 101-105.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* **360**(15): 1500-1508.
- Villarroya, F. 1998. Differential effects of retinoic acid on white and brown adipose tissues. An unexpected role for vitamin A derivatives on energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* **839**(190-195).
- Villarroya, F., Giralt, M., and Iglesias, R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **23**(1): 1-6.
- Villarroya, F., Iglesias, R., and Giralt, M. 2004. Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem.* **11**(6): 795-805.
- Wako, Y., Suzuki, K., Goto, Y., and Kimura, S. 1986. Vitamin A transport in plasma of diabetic patients. *Tohoku J Exp Med.* **149**(2): 133-143.
- Wang, S., Liang, X., Yang, Q., Fu, X., Rogers, C.J., Zhu, M., Rodgers, B.D., Jiang, Q., Dodson, M.V., and Du, M. 2015. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) $\alpha 1$. *Int. J. Obes (Lond).*
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* **112**(12): 1796-1808.
- Whittle, A.J. and Vidal-Puig, A. 2012. NPs -- heart hormones that regulate brown fat? *J Clin Invest.* **122**(3): 804-807.
- Wijers, S.L., Saris, W.H., and van Marken Lichtenbelt, W.D. 2009. Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity. *Obes Rev.* **10**(2): 218-226.
- Wu, B.X., Chen, Y., Fan, J., Rohrer, B., Crouch, R.K., and Ma, J.X. 2002. Cloning and characterization of a novel all-trans retinol short-chain dehydrogenase/reductase from the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**(11): 3365-3372.
- Wu, J., Xiang, H., Qi, Y., Yang, D., Wang, X., Sun, H., Wang, F., and Liu, B. 2014. Adaptive evolution of the *STRA6* genes in mammalian. *PLoS One.* **9**(9): e108388.

- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., and Spiegelman, B.M. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. **150**(2): 366-376.
- Xue, J.C., Schwarz, E.J., Chawla, A., and Lazar, M.A. 1996. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol*. **16**(4): 1567-1575.
- Yang, Q., Graham, T., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O., Zabolotny, J., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. **436**(7049): 356-362.
- Yoshizaki, T., Kusunoki, C., Kondo, M., Yasuda, M., Kume, S., Morino, K., Sekine, O., Ugi, S., Uzu, T., Nishio, Y., Kashiwagi, A., and Maegawa, H. 2012. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **417**(1): 352-357.
- Zemany, L., Kraus, B.J., Norseen, J., Saito, T., Peroni, O.D., Johnson, R.L., and Kahn, B.B. 2014. Downregulation of STRA6 in adipocytes and adipose stromovascular fraction in obesity and effects of adipocyte-specific STRA6 knockdown in vivo. *Mol Cell Biol*. **34**(6): 1170-1186.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**(6505): 425-432.
- Ziouzenkova, O., Orasanu, G., Sharlach, M., Akiyama, T., Berger, J., Viereck, J., Hamilton, J., Tang, G., Dolnikowski, G., Vogel, S., Duester, G., and Plutzky, J. 2007a. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med*. **13**(6): 695-702.
- Ziouzenkova, O., Orasanu, G., Sharlach, M., Akiyama, T.E., Berger, J.P., Viereck, J., Hamilton, J.A., Tang, G., Dolnikowski, G.G., Vogel, S., Duester, G., and Plutzky, J. 2007b. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med*. **13**(6): 695-702.
- Zizola, C.F., Frey, S.K., Jitngarmkusol, S., Kadereit, B., Yan, N., and Vogel, S. 2010. Cellular retinol-binding protein type I (CRBP-I) regulates adipogenesis. *Mol Cell Biol*. **30**(14): 3412-3420.

Figure legends:

Figure 1

Vitamin A metabolism gene expression in SF-subcutaneous fat (A), VF-visceral fat (B), SM-skeletal muscle (C) and LIV-liver (D) of lean (□), ob/ob (■) and ob/ob+RA mice treated with RA (■). Values are mean ± SEM; n = 5-8 for each group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ob/ob compared with lean mice; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, ob/ob+RA vs ob/ob mice.

Figure 2

Total vitamin A (ROL; RE) in SF-subcutaneous fat (A), VF-visceral fat (B), SM-skeletal muscle (C) and LIV-liver (D) of lean (□), ob/ob (■) and ob/ob+RA mice treated with RA (■). Values are mean ± SEM; n = 5-8 for each group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ob/ob compared with lean mice; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, ob/ob+RA versus ob/ob mice.

Figure 3

Values of RBP4 protein (WB) in SF-subcutaneous fat (A), VF-visceral fat (B), LIV-liver (C) and respectively (SF, OF, LIV) representative Western Blot film prints (D) for lean (□), ob/ob (■) and ob/ob+RA mice treated with RA (■). Values are mean ± SEM; n = 4-8 for each group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ob/ob compared with lean mice; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, ob/ob+RA compared with ob/ob mice.

Figure 4

Effect of RA treatment on genes involved in mitochondria-genesis and energy metabolism (PGC1α; UCP1) in the SF and VF of lean (□), ob/ob (■) and ob/ob+RA mice treated with RA (■). Values are mean ± SEM; n = 5-8 for each group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ob/ob versus lean mice; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, ob/ob+RA versus ob/ob mice.

Figure 5

Effect of RA treatment on SF-subcutaneous (A) and VF-visceral fat (B) adipocytes size in ob/ob+RA mice treated with RA (■) compared to obese ob/ob (■) and Lean (□) controls. The surface area of at least 1000 cells from each mouse was used to calculate average value. Representative pictures of adipocytes in sections isolated from subcutaneous fat (A1;A2;A3) and from visceral fat (B1;B2;B3) in lean mice (□), in ob/ob (■) and in ob/ob+RA (■). Scale bar = 100 μm. (Note: Arrows on fat tissues slides indicates autophagic granules agglomerations. Arrows indicate structures suggesting early vascular and/or lymphatic infiltrations). A transferred copy in inverted light was also made, for higher contrast purposes. Values are means ± SEM; n = 4 per group; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ob/ob compared with lean mice; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, ob/ob+RA compared with ob/ob

Figure 6

Retinoid metabolism (A) and RA impact on adipocytes remodeling (B); Fat samples from our work. Infographic modeling based on literature (Bonet et al. 2012; Bonet et al. 2013; Mercader et al. 2006). Retinoic acid modulates the transcription by entering the nucleus, binding the corresponding receptors (RAR, RXR) and activating various dimers (e.g. RAR/RXR, PPAR/RXR) found in the promoters of many genes regulating the adipocyte metabolism. Among them, genes involved in adipogenesis, autophagy, lipolysis, fatty acids synthesis and oxidation, induction of beige/brown fat, energy expenditure, etc., resulting in lower adipocytes diameter, decreased obesity and a better cardio-metabolic long term prognostic. (Note: Arrows on fat tissues slides indicates possible autophagy granules agglomerations. Arrows indicate structures suggesting early vascular angiogenesis).

Table 1**PCR primer sequences**

Gene	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (3'-5')	Gene Bank Accession No.
STRA6	ACT GGC TCT GCT CTA CTA TCC	GCC CAA GAT AAC ACA GTA CCC A	NM_001162476.1
RBP4	ACT GGG GTG TAG CCT CCT TT	GGT GTC GTA GTC CGT GTC G	NM_001159487.1
CRBP1	CTG AGC AAT GAG AAT TTC GAG GA	GCG GTC GTC TAT GCC TGT C	NM_010340.1
LRAT	CTA CGG AGC AGA CAT CCT AGT	CAC AGT AGG CTG TAT GGA GTC A	NM_023624.4
RDH10	AGG CAT GGT TCG CCA CAT C	TCT CTT CCC CAC GTC ACA AGT	NM_133832.3
RALDH1	AAG AAG GGG ACA AGG CTG AT	ACT TTC CCA CCA TTG AGT GC	NM_013467.3
RALDH2	GGC CGA GGC TGA AGA GCA CC	ACA CCT CCC CCT CTG CAG GC	NM_009022.4
CRABP1	GAC AGT GGA CGG ACG CAA AT	TCC CGG ACA TAA ATT CTT GTG C	NM_013496.3
CRABP2	GAG ACG ACT TCC GTG CCC GC	CCT GGG AGG GGC AAA TGG CG	NM_007759.2
CYP26A1	CTA GGA CTC TAC CCA CAT GTC C	GTC TTC AGA GCA ACC CGA AAC C	NM_007811.2
CYP26B1	GCA AAG TGT TTG GAG CCAAGG CC	GGG ATT GGC TGT GCG GTC CG	NM_175475.3
RARa	AGG CCA TCA CAA CTA CCT GC	GGA AAG AAG AAG GCG TAG GG	NM_009024.2
RXRa	CTT TGA CAG GGT GCT AAC AGA GC	ACG CTT CTA GTG ACG CAT ACA CC	NM_011305.3
PGC1a	AGA CGG ATT GCC CTC ATT TGA	TGT AGC TGA GCT GAG TGT TGG	NM_008904.2
UCP1	TGG GAT CAA ACC CCG CTA C	ACG TCA TCT GCC AGT ATT TTG T	NM_009463.3

STRA6, Stimulated by retinoic acid gene 6; RBP4, Retinol-binding protein 4; CRBP1, Cellular retinol binding protein 1; LRAT, Lecithin: retinol acyltransferase; RDH10, Retinol dehydrogenase 10; RALDH1, Retinaldehyde dehydrogenase 1; RALDH2, Retinaldehyde dehydrogenase 2; CRABP1, Cellular retinoic acid binding protein1; CRABP2, Cellular retinoic acid binding protein 2; CYP26A1, Cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide1; CYP26B1, Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide1; RARa, Retinoic acid receptor a; RXRa, Retinoid X receptor; PGC1a, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator; UCP1, uncoupling protein 1

Based on literature, the 18S gene (here Ambion, lot # 080700) was used as a control and showed consistent expression among all animal groups in our experiments (Manolescu DC et al.2014, Sima A, Manolescu DC et al 2011, Berry et Nov 2009)

Figure 1

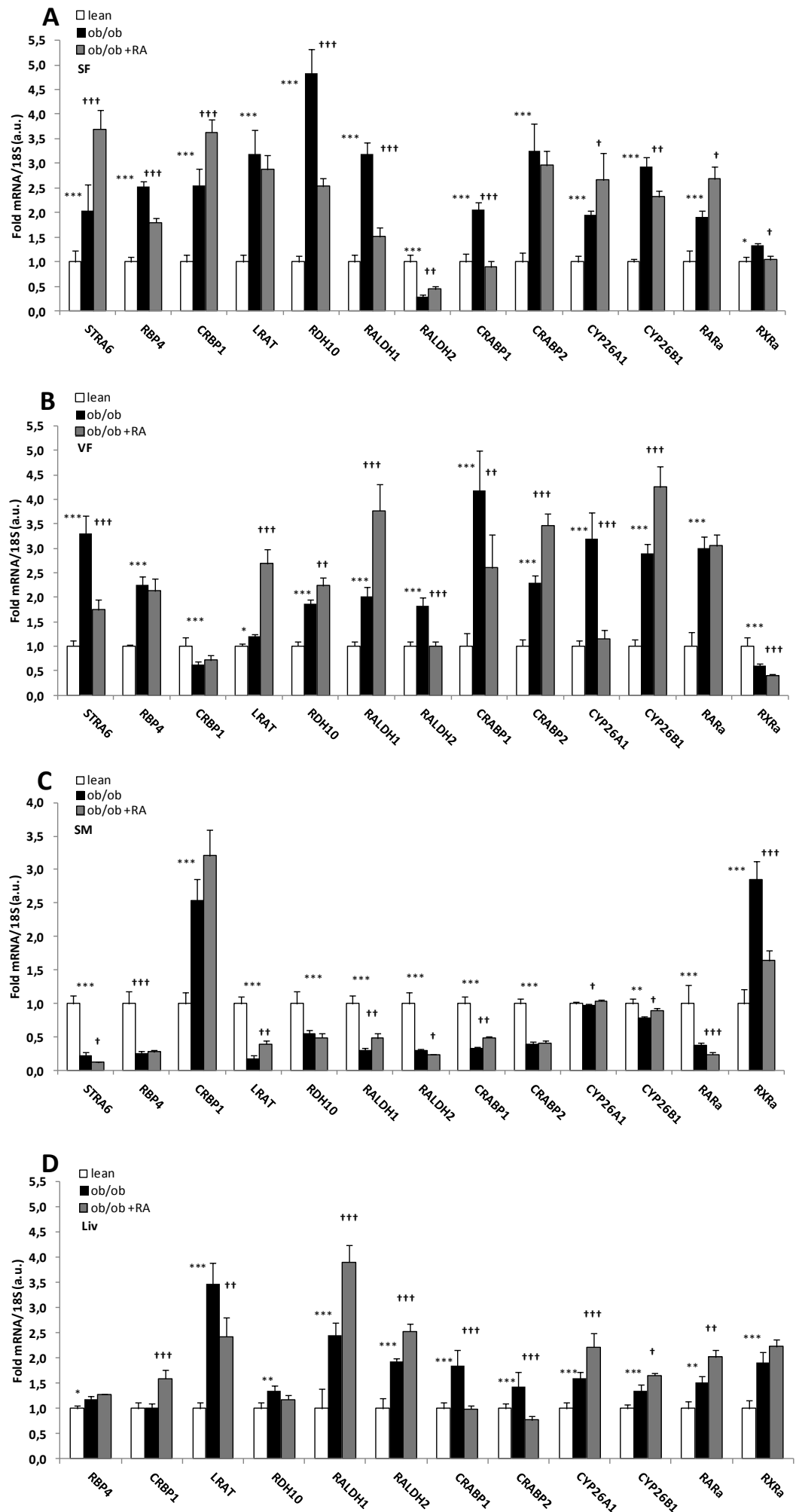


Figure 2

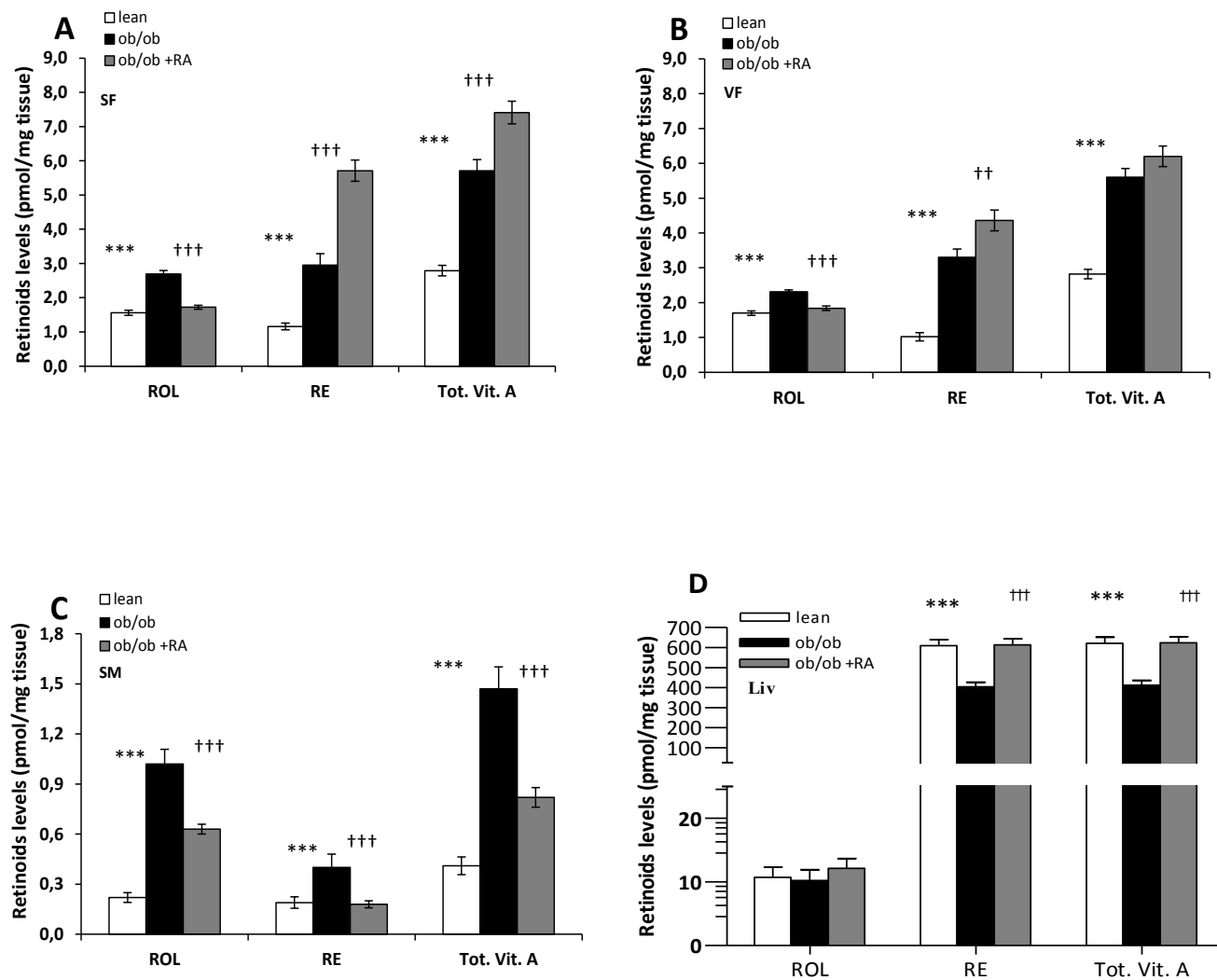


Figure 3

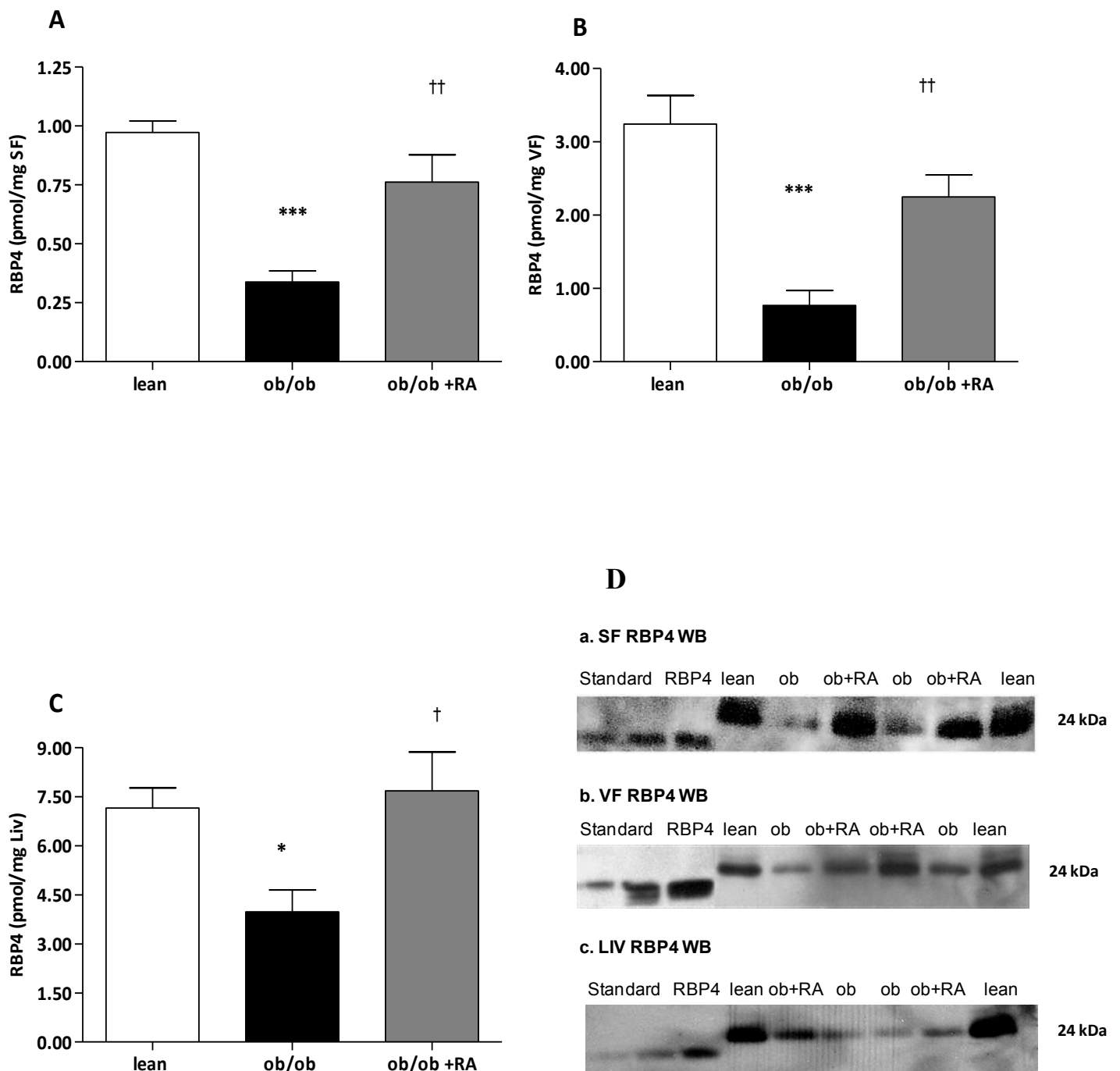


Figure 4

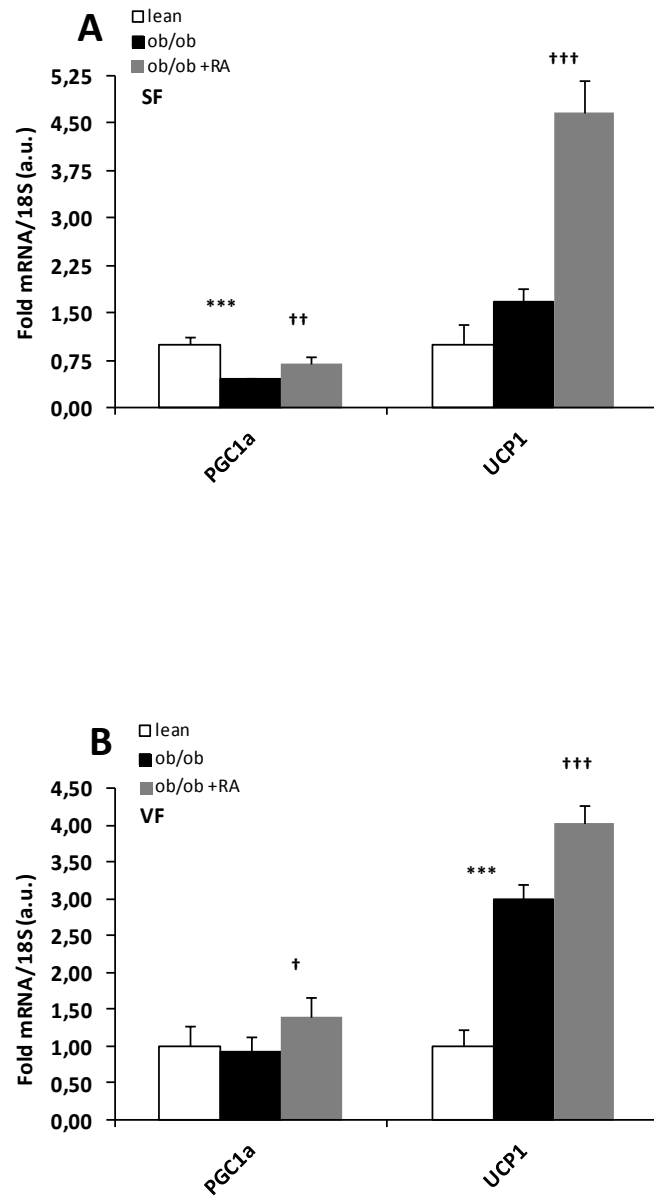


Figure 5

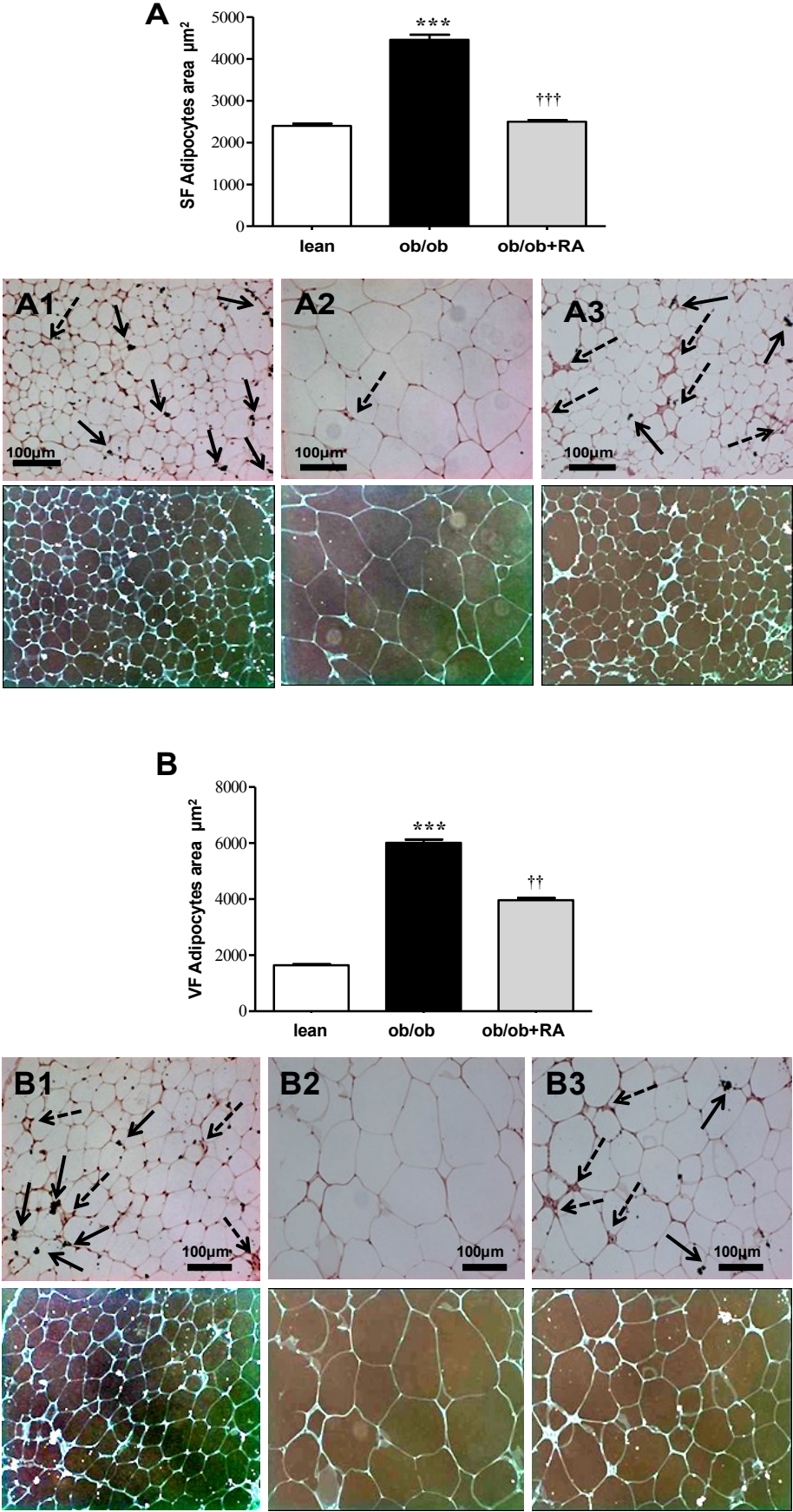
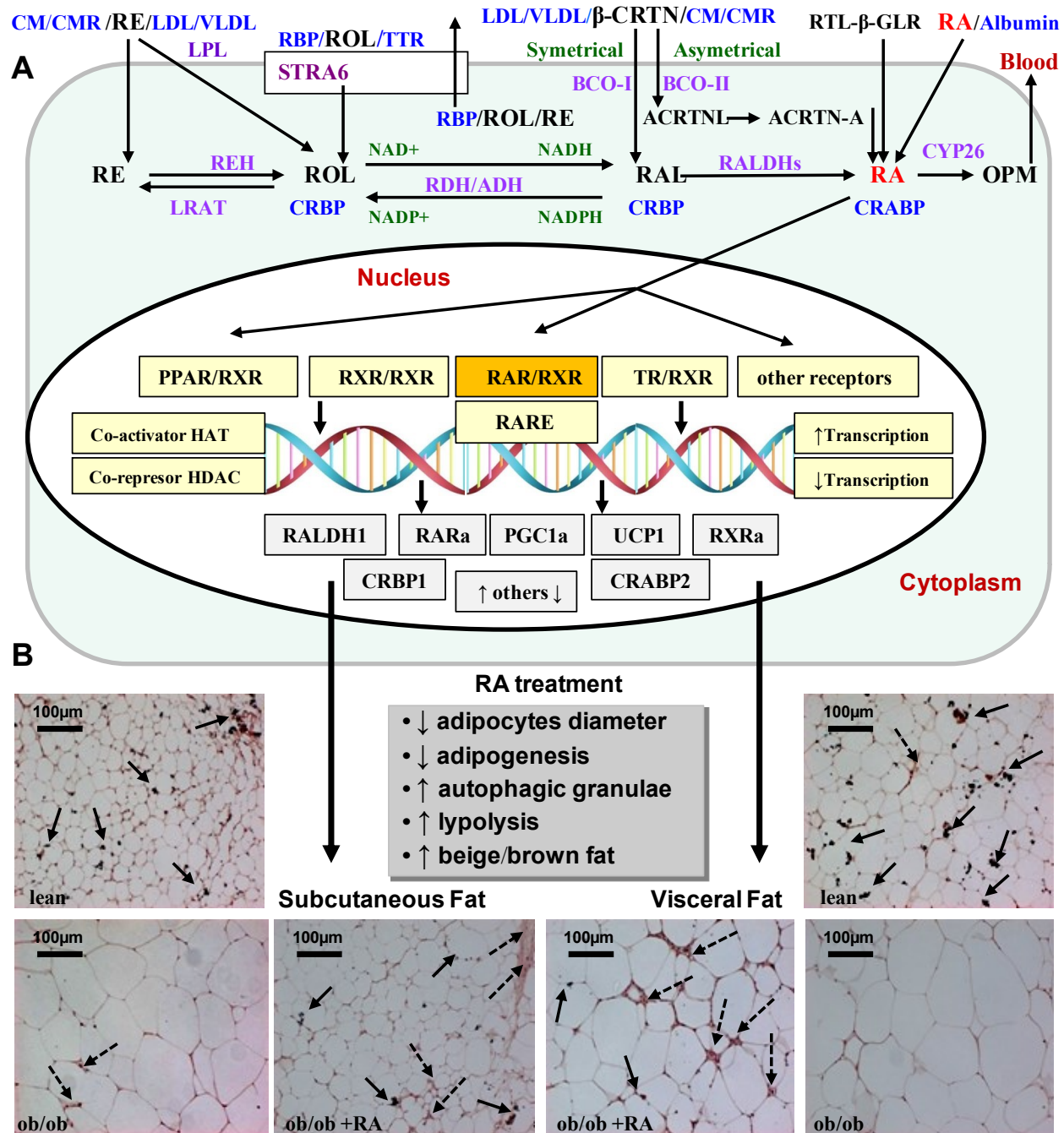


Figure 6



CHAPITRE 7 : Article 3, publié *APNM* CNS/ NRC Press, 2014

All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice

Daniel-Constantin Manolescu, Marek Jankowski, Bogdan A. Danalache, Donghao Wang
Tom L. Broderick, Jean-Louis Chiasson and Jolanta Gutkowska

Applied Physiology Nutrition and Metabolism 39; 1127-1136; 04.2014

Contributions des auteurs

Partageant l'idée originale avec Dr Yolanta Gutkowska, M. Daniel-Constantin Manolescu a contribué au succès de ce projet de recherche à tous les niveaux, assurant la définition des hypothèses et des objectifs, les revues de littérature et le choix des protocoles. Il a également participé à l'apprentissage et la mise au point des techniques, la réalisation des expérimentations, l'analyse, l'interprétation et la présentation des résultats, la rédaction du manuscrit, au choix de la revue scientifique pour publication et aux réponses aux réviseurs.

Le présent projet de recherche en collaboration a bénéficié de l'expertise de plus de 30 ans dans le domaine de l'ocytocine, peptides natriurétiques et des pathologies cardiométaboliques du laboratoire des Drs Yolanta Gutkowska et Marek Jankowski. Ils ont vérifié les techniques et la qualité des expérimentations à toutes les étapes et contribué à leur design et à l'analyse des résultats, prenant les décisions nécessaires comme directeurs de leur laboratoire.

Dr Donghao Wang a contribué par : RTqPCR, WB, l'analyse mathématique des résultats, les calculs statistiques et les présentations graphiques sous forme de figures et tableaux. Dr. Wang D est un expert reconnu en génomique et pour la grande qualité de ses techniques RT-PCR. Il a également participé aux séances de « *brainstorming* », une initiative de M. Manolescu.

Dr Bogdan A Danalache a contribué par : l'analyse microscopique de coupes histologiques des tissus adipeux après leur montage sur lamelles et colorations HE, l'analyse mathématique des résultats, les calculs statistiques et les présentations graphiques sous forme de figures et tableaux. Il a aussi participé aux séances de « *brainstorming* » initiés par M. Manolescu.

Drs Yolanta Gutkowska et Marek Yankowski nous ont aimablement fait bénéficier des expertises scientifiques et techniques de leur laboratoire pour faire et approfondir divers apprentissages sous la supervision des Drs Wang et Danalache (ex. : RTqPCR, divers modèles murins ob/ob, ob/+, db/db, histologie, microscopie) durant la présente collaboration.

Dr Tom L Broderick a apporté son expertise des impacts physiologiques et métaboliques du diabète dans divers modèles animaux (ex.: ob/ob, ob/+, db/db). Il a également contribué à améliorer la qualité de l'écriture du manuscrit pour soumission et réponse aux réviseurs.

Dr Jean-Louis Chiasson a pris la relève après le départ à la retraite du Dr Pangala V Bhat en juin 2014, assurant la continuité par sa direction pédagogique, ses conseils de rédaction et sa contribution à améliorer la qualité de l'écriture du manuscrit pour soumission.

Dr Yolanta Gutkowska a directement supervisé et contribué à toutes les étapes du manuscrit.

Dr. P.V. Bhat, le directeur du projet initial sur les rétinoïdes, a néanmoins offert des conseils consultatifs sporadiques, après sa mise à la retraite.

All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardio-protective natriuretic peptide system, and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice

Daniel-Constantin Manolescu², Marek Jankowski^{1,3}, Bogdan A Danalache¹, Donghao Wang¹, Tom L Broderick⁴, Jean-Louis Chiasson³ and Jolanta Gutkowska^{1,3,*}

¹Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, ²Laboratory of Nutrition and Cancer, ³Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM); Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada, ⁴Laboratory of Diabetes and Exercise Metabolism, Department of Physiology, Midwestern University, Glendale, AZ, USA

*Correspondence to: Jolanta Gutkowska, *Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, CRCHUM*; e-mail: jolanta.gutkowska@umontreal.ca; phone: 15148908000 ext: 13271

Key words: ob/ob mice, retinoic acid, glycaemia, oxytocin, natriuretic peptides, cardiac fibrosis, apoptosis, visceral fat, lipolysis, cardio-protection.

Applied Physiology Nutrition and Metabolism 39; 1127-1136; 04.2014

Abstract

Aim: In hypertensive rodents, retinoic acid (RA) prevents adverse cardiac remodelling and improves myocardial infarction outcome, but its role in obesity-related changes of cardiac tissue are unclear. We hypothesized that all trans RA (ATRA) treatment will improve the cardio-protective oxytocin-natriuretic peptides (OT-NPs) system, preventing apoptosis and collagen accumulation in hearts of *ob/ob* mice, a mouse model of obesity and insulin resistance.

Methods: Female 9-week-old B6.V-Lep/J *ob/ob* mice (n=16) were divided into two groups, a group (n=8) treated with 100 µg of ATRA dissolved in 100 µl corn oil (vehicle) delivered daily (~ 2µg/gbw/day) by stomach intubation for 16 days, and a group (n=8) receiving the vehicle alone. A group of non-obese littermate mice (n=9) served as controls.

Results: *ob/ob* mice exhibited obesity, hyperglycaemia and down-regulation of cardiac OT-NPs system, including the mRNA for the transcription factor GATA4, OT receptor and brain NP and the protein expression for endothelial nitric oxide synthase. Hearts from *ob/ob* mice also demonstrated increased apoptosis and collagen accumulation. ATRA treatment induced weight loss and decreased adipocytes diameter in the visceral fat, thus reducing visceral obesity which is associated with a high risk for cardiovascular disease. RA treatment was associated with a reduction in hyperglycaemia and a normalization of the OT-NPs system expression in the hearts of *ob/ob* mice. Furthermore, ATRA treatment prevented apoptosis and collagen accumulation in hearts of *ob/ob* mice.

Conclusions: The present study indicates that ATRA treatment was effective in restoring the cardio-protective oxytocin-natriuretic peptides system and in preventing abnormal cardiac remodelling in the *ob/ob* mice.

Introduction

Retinoic acid (RA), the bioactive metabolite of vitamin A, exerts a broad range of biological effects mainly by controlling various genes expression. RA acts through nuclear retinoid receptors (RAR and RXR), alters protein synthesis in the heart and regulates embryonic development, tissue homeostasis and cellular differentiation and proliferation (Pan and Baker 2007). RA also can participate in post-translational modification of proteins in a process known as retinoylation (Myhre et al. 1996). RA is a potent inducer of the oxytocin (OT) system in cardiomyocytes (Gutkowska et al. 1997), a system that stimulates the synthesis of atrial natriuretic peptide (ANP) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), all of which are critically involved in cardio-protection (Tamura et al. 2000); (Uruno et al. 2005). In addition, several studies demonstrated beneficial effects of RA treatment in both cellular and animals models of cardiovascular pathologies (Choudhary et al. 2008a, Lu et al. 2003, Paiva et al. 2005, Uruno et al. 2005, Wang H. J. et al. 2002, Wu J. et al. 1996, Zhou et al. 1995) including an improvement in insulin sensitivity in the *ob/ob* mouse model of obesity (Manolescu et al. 2010); (Bonet et al. 2012). There is a rapidly growing prevalence of obesity worldwide, often associated with hypertension, dyslipidemia and dysglycaemia, globally called the **metabolic syndrome** that provides a high risk for the development of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease (CVD). The literature suggests a link between higher risk of CVD and abdominal visceral fat deposits (Hindle et al. 2010).

The *ob/ob* mouse is characterized by extreme obesity, insulin resistance and hyperglycaemia and thus presents a phenotype considered to be a close counterpart to human obesity and type 2 diabetes (Zhang Y. et al. 1994). Cardiac abnormalities are also observed in

this 9- to 10-wk-old *ob/ob* mice model and although heart hypertrophy is absent, both cardiac apoptosis and fibrosis develop and further progress with age (Barouch et al. 2006).

Recent evidence from our laboratory indicates that these disturbances in metabolism and alterations in cardiac structure are related to a decreased synthesis related to genes linked to the cardiac OT system (Jankowski et al. 2010a, Jankowski et al. 2010b).

The potential beneficial effects of RA in preventing the metabolic and cardiac sequelae in the *ob/ob* mouse are still unclear. Examining the effects of RA in this model of severe obesity warrants investigation, not only because of the well-established risk of developing cardiovascular disease is increased in patients with obesity, but also because RA exerts a robust effect on insulin sensitivity in *ob/ob* mice and induces the OT system in cardiac tissue. Therefore, in this study, we investigated the hypothesis that RA treatment of *ob/ob* mice enhances the expression of cardio-protective genes associated with cell survival and prevention of abnormal cardiac remodelling in a model of obesity, insulin resistance and hyperglycaemia.

Materials and Methods

Animals and treatment with all-trans RA (ATRA)

All protocols were approved by the institutional Animal Care and Use Committee of the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal and in agreement with the recommendations of The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institute of Health, Publ. No. 85-23, 1986. Female 9-week-old B6.V-Lep/J *ob/ob* mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). The *ob/ob* mouse was selected because it exhibits elevated blood glucose levels and responds to RA treatment by improving insulin sensitivity (Manolescu et al. 2010); (Bonet et al. 2012). In addition, young *ob/ob* mice are

already obese and exhibit metabolic abnormalities such as insulin resistance and glucose intolerance that phenotypically resembles human type 2 diabetes. The mice were housed (4 per cage) under controlled environmental conditions and received standard rodent pellet (Harlan Teklad, no. 2018, 18% protein) containing per kg: 188 g crude protein, 60 g crude oil (9.6 g total saturated, 12.8 g total monounsaturated and 34.1 g total polyunsaturated), 38 g crude fiber, 500 g carbohydrates (450 g starch and 50 g sucrose), 32.05 g mineral mix, 2.9 g vitamin mix with a 13 kJ/g energy value. Mice were acclimatized to their new environment for 1 week before the experiment. 16 mice were randomized to either an obese control group (RA⁻; n=8) or a RA-supplemented group (RA⁺; n=8). All-trans RA (Sigma-Aldrich) was dissolved in corn oil (100 µg in 100 µL) and administered by stomach intubation daily (~2 µg/g of bw/day) in the morning for 16 days as previously described (Manolescu et al. 2010). This dose of ATRA significantly improves insulin sensitivity and glucose homeostasis in insulin-resistant *ob/ob* mice. RA⁻ mice received equal volume of corn oil vehicle. Because ATRA is a relatively unstable compound, the solution was prepared daily and stability was verified by HPLC as already described (Bhat and Lacroix 1991b)(Manolescu et al. 2010). To avoid possible RA breakdown from light exposure, all operations with RA were undertaken in dim light. The plasma glucose was measured every day during ATRA treatment of *ob/ob* mice. The serum glucose concentration decreased after one week of treatment and remained consistently low after 2 weeks. On the basis of these results we decided to select a 16-day treatment with RA to study cardiac effects in *ob/ob* mice. The animals were sacrificed after an 8h-fast and 24h after the last RA administration. A group of age-matched, non-obese littermate mice (n=9), served as lean controls.

Histology of cardiac tissue and visceral adipose tissue

Histology of cardiac tissue was prepared as reported previously (Gutkowska et al. 2009). Briefly, hearts were removed and placed in 100 ml of isopentane cooled to the temperature of dry ice and kept at -80°C . Hearts were fixed by perfusion in Tissuefix solution containing neutral buffered formaldehyde solution (Laboratory Gilles Chaput Inc., Montreal, Quebec, Canada), embedded in wax, and cut into 5 μm sections. The ventricles were cross-sectioned midway between the apex and the coronary groove. The sections were stained with haematoxylin–eosin and scanned, and the images of surfaces of ventricular cross-sections were measured using Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://www.nih>). To measure myocytes size, the surface of 50 cells was recorded manually, at least in seven photographs, and calculated in μm^2 . The red collagen deposits in the picro-sirius-stained sections (double refraction) allowed specific separation of red collagen fluorescence on black background. Quantification of collagen was performed using Image-J software and threshold function. DNA apoptosis was investigated by DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Cat. No: G3250, Promega Corporation, Madison, WI, USA). Photographs were taken with the inverted microscope equipped with a Q Imaging QICAMIR Fast Digital 1394 CCD camera and Q Capture acquisition software. Immunocytochemistry was performed according to a previously published protocol (Jankowski et al. 2010b).

Measurement of adipocytes surface area

The surface area of adipocytes was measured in visceral fat tissue after embedment in paraffin. Sections of 8µm were cut transversally and mounted on polylysine-treated slides (Cat. No. P-4981, Esco, Erie Scientific Co., Portsmouth, NH). The sections were stained with haematoxylin - eosin. Photographs were taken in inverted microscope Olympus MODEL IX51 equipped with Q Imaging QICAMIR Fast Digital 1394 CCD camera and Q Capture acquisition software. The area of single cells was calculated from the image of their planar surface using Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)). The surface of at least 1000 cells was analysed manually using Threshold, Watershed and ROY Manager functions and presented in µm².

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gene expression was measured by relative quantitative RT-PCR as recently reported (Gutkowska et al. 2007). The oligonucleotide primers used for real-time quantitative PCR are listed in Table 1. The relative expression of the RT-PCR products was determined according to the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Gutkowska et al. 2007). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was chosen for normalization because we examined the stability of its expression between the experimental groups in relation to the amount of total cardiac RNA as well as 18 S RNA (AM 1716, Ambion, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and results indicated that GAPDH was not affected by diabetes. As a control, melting point analysis revealed that each of the primer pairs amplified a single predominant product, and agarose electrophoresis demonstrated PCR products of single bands of predicted size.

Western blot analysis

Tissue samples were prepared by homogenization in modified RIPA buffer (1× PBS, 1% Igepal CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mg mL⁻¹ PMSF, 0.001% aprotinin, 100 mM sodium orthovanadate and 4% protease inhibitor), and maintained in constant agitation for 2 h at 4 °C and then centrifuged at 10 000 *g* for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected and the protein concentration was determined by the modified Bradford assay. Twenty micrograms of total protein was applied to each well of a 10% SDS polyacrylamide gel and electrophoresed for 2 h at 130 V along with a set of molecular weight markers (RPN800; Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, QC, Canada). The resolved protein bands were then transferred onto PVDF membranes (Hybond-C; GE Healthcare, Piscataway, NJ) at 30 V for 2 h at room temperature using a transfer buffer (25 mmol L⁻¹ Tris base, 192 mmol L⁻¹ glycine and 20% methanol). The transfer efficiency was verified by Ponceau S staining (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). The blots were blocked for 1 h at room temperature with blocking buffer (10% non-fat milk in 10 mmol L⁻¹ Tris, pH 7.5, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20). The blocking buffer was decanted and blots were incubated overnight at 4 °C with the following specific first antibodies: anti-OTR (sc-8102; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-endothelial nitric oxide synthase (anti-eNOS, sc-654; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl-xl (sc-7195; Santa Cruz Biotechnology), anti-Caspase 3 (sc-7148; Santa Cruz Biotechnology), anti-GATA4 (sc-25310; Santa Cruz Biotechnology), and anti-ALDH1A1 (ab6192, AbCAM, Burlington, ON, Canada). After washing three times with TBS buffer (10 mmol L⁻¹ Tris, pH 7.5, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20), the membranes were incubated with an appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody according to the manufacturer's protocol. As an internal control, blots were reprobbed with an anti-GAPDH antibody (1 : 20 000, G9545; Sigma,

St Louis, MO, USA). The blots were finally visualized using a chemiluminescence detection system (RPN2132, Amersham). Densitometric measurement of bands was performed by SCION Image software (Scion, Frederick, MD, USA). Each experiment was repeated twice in order to have reproducible results. The value of band intensity for the tested protein was divided by the corresponding value for the GAPDH band. The result for the left ventricle (LV) of the control group was selected arbitrarily as 1. Consequently, the values in other groups were presented as a magnitude of the control in arbitrary units (a.u.).

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SE. Multiple comparisons were performed by one-way ANOVA and Neuman-Keuls exact probability test (Graph Pad, San Diego, CA). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effects of ATRA treatment on plasma glucose, obesity and visceral fat

Daily food consumption was similar between untreated (5.4 ± 0.14 g/mouse) and ATRA treated (5.1 ± 0.13 g/mouse) mice (Manolescu et al. 2010). Figure 1 shows the effects of ATRA treatment on plasma glucose and physical characteristics of the *ob/ob* mice. *Ob/ob* mice were hyperglycemic and ATRA treatment normalized plasma glucose ($P < 0.01$) levels (Fig. 1A). Body weight was considerably higher in *ob/ob* mice compared to the lean control mice. Treatment with ATRA resulted in a significant reduction in body weight gain in the treated versus untreated *ob/ob* mice (7.4% less; $P < 0.05$) (Fig. 1B). In contrast, heart weight (Fig. 1C) was not different between the 3 groups. Because of the greater body weight in *ob/ob* mice, the heart to body weight ratio was significantly lower in the *ob/ob* mice compared to lean controls

(Fig. 1D). This parameter was not corrected by ATRA treatment. The reduction of body weight in *ob/ob* mice treated with ATRA involved significant reduction in the diameter of adipocytes dissected from visceral fat (Fig. 2A to 2D; $p < 0.01$).

Effects of ATRA treatment on RA metabolism, cell structure and apoptosis in cardiomyocytes

ATRA treatment resulted in a 2-fold increase in CYP26A1 mRNA, a highly specific RA catabolic enzyme mediating the hydroxylation of all-trans-retinoic acid in the heart (Fig. 3A). ATRA treatment also induced a 40% decrease in ALDH1A1 protein level, the enzyme which catalyzes the oxidation of retinaldehyde (RAL) to endogenous RA (Fig. 3B). The size of the cardiomyocytes was similar in the *ob/ob* mice compared to the lean controls and were not affected by the 16-day ATRA treatment (Fig. 4A1, 4A2 and 4A3). Apoptosis of cells in cardiac sections was ~3-fold higher in the *ob/ob* mice compared to lean controls (Fig. 4B1 and 4B2; $p < 0.01$). ATRA treatment reduced apoptosis in *ob/ob* mice by 58% (Fig. 4B3 and 4B4). Increased collagen deposits were observed in the hearts of *ob/ob* mice (Fig. 4C2 and 4D2) compared to the lean controls (Fig. 4C1 and 4D1). ATRA treatment prevented the accumulation of collagen (Fig. 4C3 and 4D3). These observations were confirmed by measurement of collagen-positive areas using polarized light (Fig. 4D4). As illustrated in Fig. 5, ATRA treatment favourably affected cardio-myocyte genes involved in the regulation of apoptosis. The anti-apoptotic protein, Bcl-xl, was down-regulated in *ob/ob* mice compared to the *ob*^{+/+} lean control mice and was normalized by ATRA treatment (Fig. 5A, $P < 0.01$). A down-regulation of Bcl-2 mRNA, a pro-apoptotic marker, was also observed in *ob/ob* mice (Fig. 5B, $P < 0.01$) while the expression of Bax mRNA was similar compared to lean controls and both genes were not affected by ATRA treatment (Fig. 5C and 5B). However, an improvement in the expression

ratio of anti-apoptotic Bcl-2/pro-apoptotic Bax genes was observed (Fig. 5D, $P < 0.05$). Furthermore, a significant increase of both caspase 3 proteins (the 32 KDa pro-caspase 3 and the active 17 KDa cleaved-caspase 3) was observed in *ob/ob* mice cardio-myocytes, a pro-apoptotic profile that was prevented by ATRA treatment (Fig. 5E and Fig.5F; $P < 0.05$).

Effects of RA treatment on cardio-protective genes

Because diabetes in rodents is associated with a reduction in GATA4 levels in the heart (Kobayashi S. et al. 2007), we investigated the expression of this transcription factor which is important for cell survival in *ob/ob* mice. As illustrated in Figure 6, *ob/ob* mice cardiomyocytes showed a down-regulation of GATA4 protein (Fig. 6A) without any change in GATA4 transcripts (Fig. 6B). However, ATRA treatment was associated with an up-regulation of GATA4 protein level and mRNA expression. Because *ob/ob* mice develop a cardiomyopathy in an age-dependent manner, it was logical to expect that deficiency of GATA4 would influence genes regulated by these factors in the heart, namely NPs and eNOS. As presented in Figure 6C, there was no significant change in the expression of ANP mRNA in the heart of all 3 groups. However, BNP mRNA (Fig. 6D) was significantly down-regulated in hearts from *ob/ob* mice and was totally restored by ATRA treatment to levels observed in cardiomyocytes from lean controls. Consistent with an altered cardiac BNP mRNA in *ob/ob* mice, a significant down-regulation was observed in the expression of OT mRNA that was totally prevented by ATRA treatment (Fig. 6E; $p < 0.05$). Furthermore, hearts from *ob/ob* mice also showed a down-regulation of OTR transcripts and proteins that were up-regulated by ATRA treatment (Fig. 6F and 6G; $p < 0.05$). Also consistent with an altered cardiac OT system in the heart of *ob/ob* mice,

eNOS protein levels were lower compared to lean control mice. ATRA treatment of *ob/ob* mice increased eNOS protein level (Fig. 7, $p<0.05$).

Discussion

The *ob/ob* mouse is a leptin deficient model characterized by severe obesity, insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperglycaemia (Mazumder et al. 2004). The mice develop cardiac dysfunctions over time (Schmieder and Messerli 1987);(Van den Bergh et al. 2008) associated with a reduction in BNP synthesis (Cao and Gardner 1995), collagen accumulation in the heart and apoptosis of cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). In the present study, we demonstrate that ATRA treatment in *ob/ob* mice prevents fibrosis and collagen accumulation in the heart and apoptosis of cardiomyocytes, defects known to increase the risk for later development of cardiac dysfunction. Furthermore, these effects are associated with a decreased body weight gain and a significant improvement in glucose metabolism (Manolescu et al. 2010).

In the untreated *ob/ob* mice, average body weight was increased almost 2-fold by the time they reached the age of 12 weeks, compared to lean control animals. The ATRA treatment resulted in a small but significant reduction in weight gain (7.4%; $p<0.05$) in *ob/ob* mice. This effect was due, at least in part, to a reduction in the size of adipocytes in the visceral fat (Fig. 2). This was associated with lower fasting plasma glucose concentrations indicating an improvement in glucose metabolism (Fig. 1A). This is consistent with our previous findings of ATRA treatment being associated with improvement in insulin sensitivity and glucose tolerance in *ob/ob* mice (Manolescu et al. 2010). The reduction in weight gain and a smaller adipocytes size in the visceral fat were observed despite no difference in food consumption in treated versus untreated animals, suggesting that ATRA treatment was associated with increased energy expenditure. Recently, ANP and BNP were described as heart hormones influencing brown fat

metabolism (Whittle and Vidal-Puig 2012) and acting via several mechanisms (e.g. cGMP/PKG/p38MAPK, PGC-1 α , UCP1) to induce a brown fat thermogenic program in mouse and human white adipocytes (Bordicchia et al. 2012)(Bonet et al. 2013). This observation suggests that the heart can be considered as playing a role in the adipose tissue biology. This is consistent with the observation that transgenic mice over-expressing BNP are lean and resistant to diet-induced obesity, presumably due to reduction in fat tissue and increased lipolysis (Miyashita et al. 2009). Furthermore, it has been observed in obese rodents; that RA treatment increased lipolysis resulting in a decrease in body fat content (Bonet et al. 2012), and an increased in peripheral insulin sensitivity (Lundgren et al. 2007). There are also evidences that RA suppresses adipogenesis in vivo and contributes to the ability of the hormone to counteract diet-induced obesity (Berry et al. 2012b) and genetic obesity as reported in the present study. There are also evidences that adipogenesis depends on endogenous production of RA by ALDH1A1 enzymes (Reichert et al. 2011). However, Reichert et al. (Reichert et al. 2011) showed that exogenously supplied RA to C57/BL6 mice resulted in ALDH1A1 inhibition and suppression of fat formation. Similarly, in the present study, it was observed that ATRA treatment was associated with a lower expression of RALH1 in the heart of *ob/ob* mice; the significance of this potential feedback mechanism in the heart is difficult to explain.

The level of natriuretic peptides in plasma and cardiac tissue is known to be reduced in obesity, diabetes and insulin resistant states, in both the mouse models as well as in humans (Moro et al. 2004);(Moro 2013). BNP is generally viewed as a cardio-protective hormone preventing pathological hypertrophy, fibrosis and apoptosis of cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). In this study we have observed that the low expression of BNP seen in the heart of *ob/ob* mice was normalized by ATRA treatment. It is suggested that the changes related to BNP deficit

are reversed, at least in part, through the action of ATRA. Indeed, our recent study in *db/db* mice deficient in leptin receptor, indicated that the enhancement of BNP significantly reduced the development of obesity, glucose intolerance and insulin resistance as well as some structural and functional changes of the heart (Plante et al. 2014a). BNP treatment decreased accumulation of fat, and adipocytes diameter associated with a decrease in weight gain, promoted insulin sensitivity, and improved glycaemic control. It was also observed that the hyperphagic response to BNP treatment with the appearance of brown-like adipocytes expressing UCP1 promotes cellular energy dissipation as heat. The cardioprotective effects of BNP were attributed to the inhibition of cardiomyocyte apoptosis, myocardial fibrosis and the cardiac hypertrophy as well as normalisation of cardiac AMP-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase activities. The anti-fibrotic activity of BNP is supported by the observation that cardiac fibrosis is a dominant feature in mice lacking BNP (Tamura et al. 2000). Beneficial effects of RA treatment on cardiac fibrosis have also been reported in hypertensive rats (Lu et al. 2003), in experimental myocardial infarction (Paiva et al. 2005) and in aortic-banded rats (Choudhary et al. 2008b). Furthermore, angiotensin II-induced cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis are inhibited by ATRA treatment (He et al. 2006), indicating that RA-mediated cell signalling is involved in regulating cardiac fibrosis.

In the adult heart, the transcription factor GATA4 has been shown to have both anti-fibrotic and anti-apoptotic effects (Huang et al. 2008) by stimulating the production of ANP and BNP, and Bcl-2, respectively. The reduction in GATA4 protein content seen in hearts of *ob/ob* mice is consistent with other models of hyperglycaemia, including *db/db* mice and streptozotocin-treated rats (Kobayashi S. et al. 2007). The decrease expression of GATA4 is suggested to occur as a result of high circulating glucose levels (Kobayashi S. et al. 2007); this is consistent with

observations in other models of diabetes where the synthesis of BNP as well as anti-apoptotic genes are reduced in cardiomyocytes (Cao and Gardner 1995). In the present study, ATRA treatment of *ob/ob* mice attenuated the hyperglycemia, normalized GATA4 protein content in the heart and increased the synthesis of GATA4-related peptides (fig 6D-G), including BNP and Bcl-2. The decrease in collagen formation and rate of apoptosis of cardiomyocytes in hearts of RA-treated obese mice is consistent with the up-regulation of GATA4 and downstream protective genes. This protective role of GATA4 is supported by the observation in experimental myocardial infarction in rats, that the peri-infarct intramyocardial delivery of GATA4 gene via adenoviral vector prevented adverse post-infarction heart remodelling through myocardial angiogenesis, anti-apoptosis, and stem cell recruitment (Rysa et al. 2010). Reports have also demonstrated that GATA4 synthesis can be induced by RA treatment (Arceci et al. 1993), further implicating a role for RA in the synthesis of GATA4-related peptides in the prevention of cardiac apoptosis and fibrosis.

ATRA treatment was associated with a normalization of oxytocin (OT) and oxytocin receptor (OTR), found to be down-regulated in non-treated *ob/ob* mouse hearts (Fig.6 E, F,G). As previously reported, RA treatment of rats at day 21 of gestation produced a significant 2- to 3-fold increase of cardiac OT protein concentration and OT mRNA levels in the fetal heart (Jankowski et al. 2004). Further analysis of P19 embryonic carcinoma cells indicated that GATA-4 is a component of the ATRA-mediated cardiogenic pathway linked to cardiomyocytes differentiation stimulated by OT (Jankowski et al. 2004). This is consistent with the presence of GATA4-regulated element on OTR gene promoter (Uchida et al. 2007). Recent studies revealed important central and peripheral actions of OT in obesity (Deblon et al. 2011, Zhang G. and Cai 2011), and rats treated with OT had smaller adipocytes compared with control animals

(Eckertova et al. 2011). An increase in OT expression following ATRA treatment in hearts of *ob/ob* mice is clearly cardioprotective based on earlier work indicating that OT increases antioxidant markers (Szeto A. et al. 2008), activates mitochondrial K_{ATP} channels (Alizadeh et al. 2010), inhibits cell death pathways via phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway (Kobayashi H. et al. 2009), generates nitric oxide production (Danalache et al. 2007), confers anti-inflammatory protection (Jankowski et al. 2010a) and stimulates NP production (Gutkowska et al. 1997). Furthermore, OT activates signalling pathways in cardiac muscles that overlap with those of insulin (Florian et al. 2010), promoting glucose uptake and possibly indirectly mediating the effect of RA on plasma glucose levels in obese mice.

Another stimulator of cGMP/PKG-pathway is NO produced mainly in the heart by eNOS and involved in the cardiovascular system cell cycle (Ignarro et al. 1999). Our study shows that eNOS expression is reduced in *ob/ob* mice and that ATRA treatment reversed this to level comparable to control hearts. It has been demonstrated that ATRA increased nitric oxide production by eNOS phosphorylation through RAR-mediated phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in endothelial cells and possibly plays beneficial roles in vascular endothelium (Urano et al. 2005). Furthermore, others have shown that ATRA treatment also increases the PI3K/Akt pathway in endothelial cells (Urano et al. 2005) a pathway found to be decreased in *ob/ob* mice (Trivedi et al. 2008).

Study limitations

Our investigations demonstrate that the mechanism of action of ATRA can include direct actions on the heart. However, the functional aspect of the cardiac ATRA receptors was not addressed. In this respect the hypothesis of Reichert et al. (Reichert et al. 2011) need to be considered. Accordingly, the ATRA has the highest affinity for binding to RAR which activates RAR

heterodimerization with RXR and this complex binds to a RA response element (RARE) in target genes which may include OTR and natriuretic peptides as suggested in figure 8. Furthermore, to better address the aspect of gene regulation, it would be important to perform the molecular study of ATRA regulation in cardiomyocytes isolated from adult *ob/ob* mice. It is important to examine if the ATRA effect on eNOS phosphorylation reported previously (Urano et al. 2005) is also observed in cardiomyocytes of *ob/ob* mice. More investigations in various fat tissue topology and obese mice models (e.g. *ob/ob*, *db/db*); may be useful to address whether enhancing and/or inducing "fat browning process" pass mainly through increasing natriuretic peptides (BNP, ANP) levels or if a direct action of RA treatment on some specific genes of brown fat metabolism (e.g.UCP1, PGC-1 α) is also involved (Bonet et al. 2012).

Conclusion

RA treatment in the *ob/ob* mice, a model of obesity, insulin resistance and hyperglycaemia, resulted in decreased weight gain, lower visceral adipocytes size and improvement in glucose tolerance. These beneficial phenotypes were associated with normalization of BNP, OT and OTR genes expression (mRNA) and of GATA4, OTR and eNOS protein level in cardiomyocytes as well as an up-regulation of the anti-apoptotic genes and a down-regulation of the pro-apoptotic genes. These effects resulted in a decrease in collagen accumulation and a reduction in apoptosis of cardiomyocytes. The present findings further support the concept of the GATA4-oxytocin-natriuretic peptide cardio-protective system as a key player in the prevention of abnormal cardiac remodelling associated with obesity and diabetes.

<

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP-53217, NET Program) and the Canadian Heart and Stroke Foundation (CHSF) as grants to JG and MJ, and by the Office of Research and Sponsored Programs of Midwestern University to TLB.

D-C Manolescu is a fellow of Québec FRQS (05.2012/05.2014) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and fellow of Banting and Best/Canadian Institute of Health Research (CIHR 01.2014/12.2015) PhD Scholarship.

Conflict of Interest:

Author disclosures: D-C Manolescu, M. Jankowski, B. Danalache, D. Wang, T. L. Broderick, J-L Chiasson and J. Gutkowska have no conflicts of interest.

References

- Alizadeh, A.M., Faghihi, M., Sadeghipour, H.R., Mohammadghasemi, F., Imani, A., Houshmand, F., and Khor, V. 2010. Oxytocin protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via pathway involving mitochondrial ATP-dependent potassium channel. *Peptides*. **31**(7): 1341-1345.
- Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Wilson, D.B. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Molecular and cellular biology*. **13**(4): 2235-2246.
- Berry, D.C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C.M., and Noy, N. 2012. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes*. **61**(5): 1112-1121.
- Bhat, P.V. and Lacroix, A. 1991. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol*. **69**(6): 826-830.
- Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochimica et biophysica acta*. **1821**(1): 177-189.
- Bonet, M.L., Oliver, P., and Palou, A. 2013. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et biophysica acta*. **1831**(5): 969-985.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of clinical investigation*. **122**(3): 1022-1036.
- Cao, L. and Gardner, D.G. 1995. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension*. **25**(2): 227-234.
- Choudhary, R., Baker, K.M., and Pan, J. 2008a. All-trans retinoic acid prevents angiotensin II- and mechanical stretch-induced reactive oxygen species generation and cardiomyocyte apoptosis. *J Cell Physiol*. **215**(1): 172-181.
- Choudhary, R., Palm-Leis, A., Scott, R.C., 3rd, Guleria, R.S., Rachut, E., Baker, K.M., and Pan, J. 2008b. All-trans retinoic acid prevents development of cardiac remodeling in aortic

- banded rats by inhibiting the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **294**(2): H633-644.
- Danalache, B.A., Paquin, J., Donghao, W., Grygorczyk, R., Moore, J.C., Mummery, C.L., Gutkowska, J., and Jankowski, M. 2007. Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis. *Stem Cells*. **25**(3): 679-688.
- Deblon, N., Veyrat-Durebex, C., Bourgoin, L., Caillon, A., Bussier, A.L., Petrosino, S., Piscitelli, F., Legros, J.J., Geenen, V., Foti, M., Wahli, W., Di Marzo, V., and Rohner-Jeanrenaud, F. 2011. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. *PloS one*. **6**(9): e25565.
- Eckertova, M., Ondrejckova, M., Krskova, K., Zorad, S., and Jezova, D. 2011. Subchronic treatment of rats with oxytocin results in improved adipocyte differentiation and increased gene expression of factors involved in adipogenesis. *British journal of pharmacology*. **162**(2): 452-463.
- Florian, M., Jankowski, M., and Gutkowska, J. 2010. Oxytocin increases glucose uptake in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*. **151**(2): 482-491.
- Gutkowska, J., Paquette, A., Wang, D., Lavoie, J.M., and Jankowski, M. 2007. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **293**(1): R267-275.
- Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H.H., and McCann, S.M. 1997. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**(21): 11704-11709.
- Gutkowska, J., Broderick, T.L., Bogdan, D., Wang, D., Lavoie, J.M., and Jankowski, M. 2009. Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: possible implications in cardiomyopathy. *The Journal of physiology*. **587**(Pt 19): 4725-4736.
- He, Y., Huang, Y., Zhou, L., Lu, L.M., Zhu, Y.C., and Yao, T. 2006. All-trans retinoic acid inhibited angiotensin II-induced increase in cell growth and collagen secretion of neonatal cardiac fibroblasts. *Acta pharmacologica Sinica*. **27**(4): 423-429.
- Hindle, A.K., Edwards, C., McCaffrey, T., Fu, S., and Brody, F. 2010. Identification of cardiovascular genes in omentum from morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*. **34**(6): 1020-1027.

- Huang, Y., Wright, C.D., Kobayashi, S., Healy, C.L., Elgethun, M., Cypher, A., Liang, Q., and O'Connell, T.D. 2008. GATA4 is a survival factor in adult cardiac myocytes but is not required for α 1A-adrenergic receptor survival signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **295**(2): H699-707.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. 1999. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of cardiovascular pharmacology.* **34**(6): 879-886.
- Jankowski, M., Wang, D., Danalache, B., Gangal, M., and Gutkowska, J. 2010a. Cardiac oxytocin receptor blockade stimulates adverse cardiac remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **299**(2): H265-274.
- Jankowski, M., Danalache, B., Wang, D., Bhat, P., Hajjar, F., Marcinkiewicz, M., Paquin, J., McCann, S.M., and Gutkowska, J. 2004. Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **101**(35): 13074-13079.
- Jankowski, M., Bissonauth, V., Gao, L., Gangal, M., Wang, D., Danalache, B., Wang, Y., Stoyanova, E., Cloutier, G., Blaise, G., and Gutkowska, J. 2010b. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* **105**(2): 205-218.
- Kobayashi, H., Yasuda, S., Bao, N., Iwasa, M., Kawamura, I., Yamada, Y., Yamaki, T., Sumi, S., Ushikoshi, H., Nishigaki, K., Takemura, G., Fujiwara, T., Fujiwara, H., and Minatoguchi, S. 2009. Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis. *Journal of cardiovascular pharmacology.* **54**(6): 510-519.
- Kobayashi, S., Mao, K., Zheng, H., Wang, X., Patterson, C., O'Connell, T.D., and Liang, Q. 2007. Diminished GATA4 protein levels contribute to hyperglycemia-induced cardiomyocyte injury. *The Journal of biological chemistry.* **282**(30): 21945-21952.
- Lu, L., Yao, T., Zhu, Y.Z., Huang, G.Y., Cao, Y.X., and Zhu, Y.C. 2003. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intrarenal arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**(4): H1370-1377.

- Lundgren, M., Svensson, M., Lindmark, S., Renstrom, F., Ruge, T., and Eriksson, J.W. 2007. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia*. **50**(3): 625-633.
- Manolescu, D.C., Sima, A., and Bhat, P.V. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr*. **140**(2): 311-316.
- Mazumder, P.K., O'Neill, B.T., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Boudina, S., and Abel, E.D. 2004. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*. **53**(9): 2366-2374.
- Miyashita, K., Itoh, H., Tsujimoto, H., Tamura, N., Fukunaga, Y., Sone, M., Yamahara, K., Taura, D., Inuzuka, M., Sonoyama, T., and Nakao, K. 2009. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes*. **58**(12): 2880-2892.
- Moro, C. 2013. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.
- Moro, C., Crampes, F., Sengenès, C., De Glisezinski, I., Galitzky, J., Thalamas, C., Lafontan, M., and Berlan, M. 2004. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J*. **18**(7): 908-910.
- Myhre, A.M., Takahashi, N., Blomhoff, R., Breitman, T.R., and Norum, K.R. 1996. Retinoylation of proteins in rat liver, kidney, and lung in vivo. *Journal of lipid research*. **37**(9): 1971-1977.
- Paiva, S.A., Matsubara, L.S., Matsubara, B.B., Minicucci, M.F., Azevedo, P.S., Campana, A.O., and Zornoff, L.A. 2005. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr*. **135**(10): 2326-2328.
- Pan, J. and Baker, K.M. 2007. Retinoic acid and the heart. *Vitam Horm*. **75**(257-283).
- Plante, E., Menaouar, A., Danalache, B.A., Broderick, T.L., Jankowski, M., and Gutkowska, J. 2014. Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice. *Diabetologia*.
- Reichert, B., Yasmeen, R., Jeyakumar, S.M., Yang, F., Thomou, T., Alder, H., Duester, G., Maiseyeu, A., Mihai, G., Harrison, E.H., Rajagopalan, S., Kirkland, J.L., and Zouzenkova, O. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol Endocrinol*. **25**(5): 799-809.

- Rysa, J., Tenhunen, O., Serpi, R., Soini, Y., Nemer, M., Leskinen, H., and Ruskoaho, H. 2010. GATA-4 is an angiogenic survival factor of the infarcted heart. *Circulation. Heart failure*. **3**(3): 440-450.
- Schmieder, R.E. and Messerli, F.H. 1987. Obesity hypertension. *The Medical clinics of North America*. **71**(5): 991-1001.
- Szeto, A., Nation, D.A., Mendez, A.J., Dominguez-Bendala, J., Brooks, L.G., Schneiderman, N., and McCabe, P.M. 2008. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. **295**(6): E1495-1501.
- Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., Mukoyama, M., Itoh, H., Saito, Y., Tanaka, I., Otani, H., and Katsuki, M. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(8): 4239-4244.
- Trivedi, P., Yang, R., and Barouch, L.A. 2008. Decreased p110alpha catalytic activity accompanies increased myocyte apoptosis and cardiac hypertrophy in leptin deficient ob/ob mice. *Cell Cycle*. **7**(5): 560-565.
- Uchida, S., Fuke, S., and Tsukahara, T. 2007. Upregulations of Gata4 and oxytocin receptor are important in cardiomyocyte differentiation processes of P19CL6 cells. *Journal of cellular biochemistry*. **100**(3): 629-641.
- Urano, A., Sugawara, A., Kanatsuka, H., Kagechika, H., Saito, A., Sato, K., Kudo, M., Takeuchi, K., and Ito, S. 2005. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation*. **112**(5): 727-736.
- Van den Bergh, A., Vanderper, A., Vangheluwe, P., Desjardins, F., Nevelsteen, I., Verreth, W., Wuytack, F., Holvoet, P., Flameng, W., Balligand, J.L., and Herijgers, P. 2008. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovascular research*. **77**(2): 371-379.
- Wang, H.J., Zhu, Y.C., and Yao, T. 2002. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy. *Journal of applied physiology*. **92**(5): 2162-2168.

- Whittle, A.J. and Vidal-Puig, A. 2012. NPs -- heart hormones that regulate brown fat? The Journal of clinical investigation. **122**(3): 804-807.
- Wu, J., Garami, M., Cheng, T., and Gardner, D.G. 1996. 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. The Journal of clinical investigation. **97**(7): 1577-1588.
- Zhang, G. and Cai, D. 2011. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism. **301**(5): E1004-1012.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. **372**(6505): 425-432.
- Zhou, M.D., Sucov, H.M., Evans, R.M., and Chien, K.R. 1995. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **92**(16): 7391-7395.

Figure Legends

Figure 1

Effects of RA treatment on plasma glucose level (A), body weight (B), heart weight (C) and heart/body weight ratio (D) in *ob/ob* mice (*ob/ob* RA⁺) compared obese control (*ob/ob* RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Values expressed as means \pm SEM, n = 6–8 per group. *P< 0.05, *ob/ob* compared to *ob/+*; &P< 0.05, *ob/ob*RA⁺ compared to *ob/ob* RA⁻.

Figure 2

Effect of RA treatment on visceral adipocytes size in *ob/ob* mice (*ob/ob* RA⁺) compared to obese control (*ob/ob* RA⁻) and lean controls (*ob/+*) (A). The surface area of at least 1000 cells from each mouse was used to calculate average value. Representative pictures of adipocytes in sections isolated from visceral fat in *ob/+* mice (B), in *ob/ob* RA⁻ (C) and in *ob/ob* RA⁺ (C). Scale bar = 100 μ m. Results are expressed as means \pm SEM; n = 8 per group. *P< 0.001, *ob/ob* compared to *ob/+*; &P< 0.01, *ob/ob*RA⁺ compared to *ob/ob* RA⁻.

Figure 3

Effects of RA treatment on the expression of CYP26A1 (A) and the protein level of ALDH1A1 (B) in cardiomyocytes of *ob/ob* RA⁺ compared to obese control (*ob/ob* RA⁻) and lean controls (*ob/+*) (A). Bars show the mean \pm SEM; n=6 per group, *P<0.05.

Figure 4

A-Ventricular cross-sections as follow: control section (**A1**), section of *ob/ob* RA⁻ mice (**A2**), section of *ob/ob* RA⁺ mice (**A3**) and surface area of cardiomyocytes (**A4**) (n=6-8). **B**-Apoptotic nuclei in cardiac sections of control mice (**B1**), *ob/ob* RA⁻ mice (**B2**), *ob/ob* RA⁺ mice (**B3**) and their quantitative graph bars (**B4**) (n=4). **C**-Sirius red staining collagen deposit (red color) in cardiac sections of control mice (**C1**), *ob/ob* RA⁻ mice (**C2**), *ob/ob* RA⁺ mice (**C3**) and their quantitative analysis of collagen deposits under double refraction respectively (**D1**, **D2**, **D3**). **D4**-Significant elevation of cardiac collagen deposits in *ob/ob* RA⁻ mice vs. control *ob/+* mice and *ob/ob* RA⁺ group (n=3); *P< 0.05, *ob/ob* compared to *ob/+*; &P< 0.05, *ob/ob* RA⁺ compared to *ob/ob* RA⁻. Values are mean \pm SEM. Scale bars = 50 μ m.

Figure 5

Effects of RA treatment on Bcl-xl protein level (A), BCL2 mRNA (B), BAX mRNA (C), BAX/BCL2 mRNA ratio (D), as well as on the protein level of Pro-Caspase 3 (E) and Caspase 3 (F) in cardiomyocytes of *ob/ob* RA+ compared to obese control (*ob/ob* RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Bars show the mean \pm SEM; n=6 for each group. *P< 0.05, ***P< 0.001 *ob/ob* compared to *ob/+*; &P< 0.05, *ob/ob* RA+ compared to *ob/ob* RA⁻.

Figure 6

Effects of RA treatment on GATA4 protein (A) and mRNA (B) levels, ANP mRNA (C), BNP mRNA (D), OT mRNA (E), and OTR protein (F) and mRNA (G) relative change in cardiomyocytes of *ob/ob* RA+ compared to obese control (*ob/ob* RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Bars show the mean \pm SEM; n=5-6 animals in each group. *P< 0.05, *ob/ob* compared to *ob/+*; &P< 0.05, *ob/ob* RA+ compared to *ob/ob* RA⁻.

Figure 7

The effect of RA treatment on eNOS protein level in cardiomyocytes of *ob/ob* RA+ compared to obese control (*ob/ob* RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Bars show the mean \pm SEM; n=5-6 animals in each group. *P<0.05 *ob/ob* compared to *ob/+*; †P<0.05 *ob/ob* RA+ compared to *ob/ob* RA⁻.

Figure 8

All-*trans*-RA acts by binding to the retinoic acid receptor (RAR), which is bound to DNA as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) in regions called retinoic acid response elements (RARE). This allows the complex to regulate the rate of genes transcription including transcription factor GATA4, oxytocin receptor (OTR), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and brain natriuretic peptide (BNP). BNP released from the heart should favourably regulate metabolism of adipocytes.

Table 1. PCR primer sequences.

Gene	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')	Accession no.
ANP	CCTGTGTACAGTGC GG TGTC	CCTAGAAGCACTGCCGTCTC	NM_008725
Bax	AAAGTGCCCGAGCTGATCA	AGCCACAAAGATGGTCACTGTCT	NM_007527.3
Bcl2	AGTTCGGTGGGGTCATGTGTG	CCAGGTATGCACCCAGAGTG	NM_009741
BNP	CTGAAGGTGCTGTCCAGAT	GTTCTTTTGTGAGGCC TTGG	NM_008726
CYP26A	CTAGGACTCTACCCACATGTCC	GTCTTCAGAGCAACCCGAAACC	NM_007811
GATA4	CACTATGGGCACAGCAGCTCC	TTGGAGCTGGCCTGCGATGTC	NM_008092
OT	CCTACAGCGGATCTCAGACTGA	TCAGAGCCAGTAAGCCAAGCA	NM_011025
OTR	CGACTCAGGACGAAGGTGGAGGA	AAGATGACCTTCATCATTTGTC	NM_001081147

Note: ANP, atrial natriuretic peptide; Bax, BCL2-associated X protein; Bcl2, B-cell leukemia/lymphoma 2; BNP, brain natriuretic peptide; CYP26 A, cytochrome P450 26 A; GATA4, GATA binding protein 4; OT, oxytocin; OTR, oxytocin receptor; PCR, polymerase chain reaction. 18 S (Ambion, lot no. 080700) was chosen for normalization because this gene showed consistent expression relative to other housekeeping genes among the treatment groups in our array experiments.

Figure 1

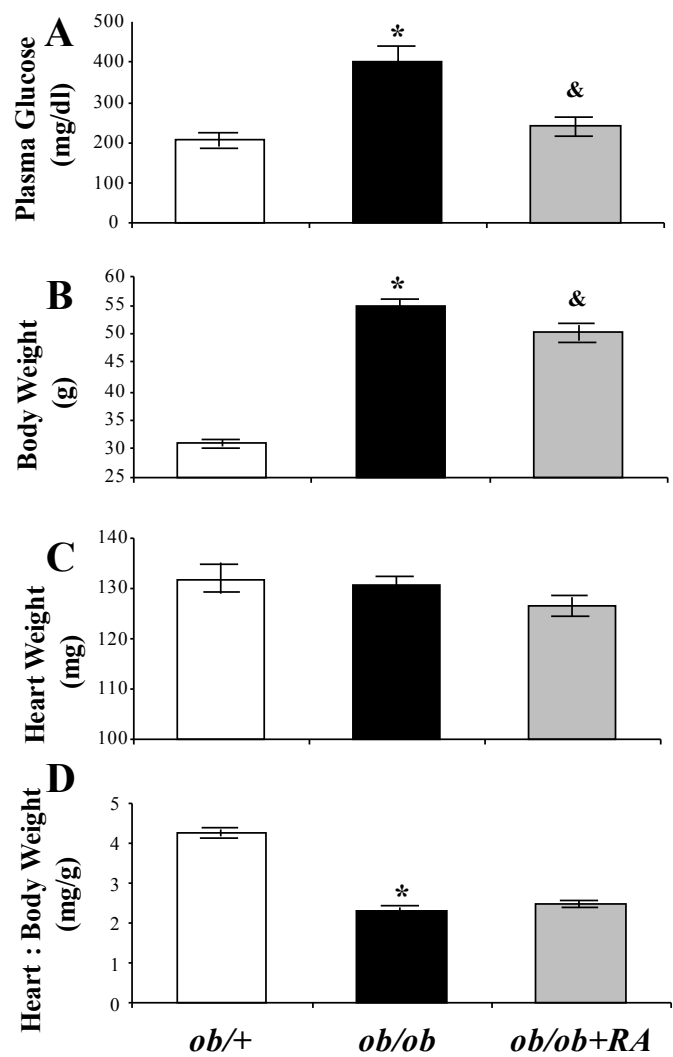


Figure 2

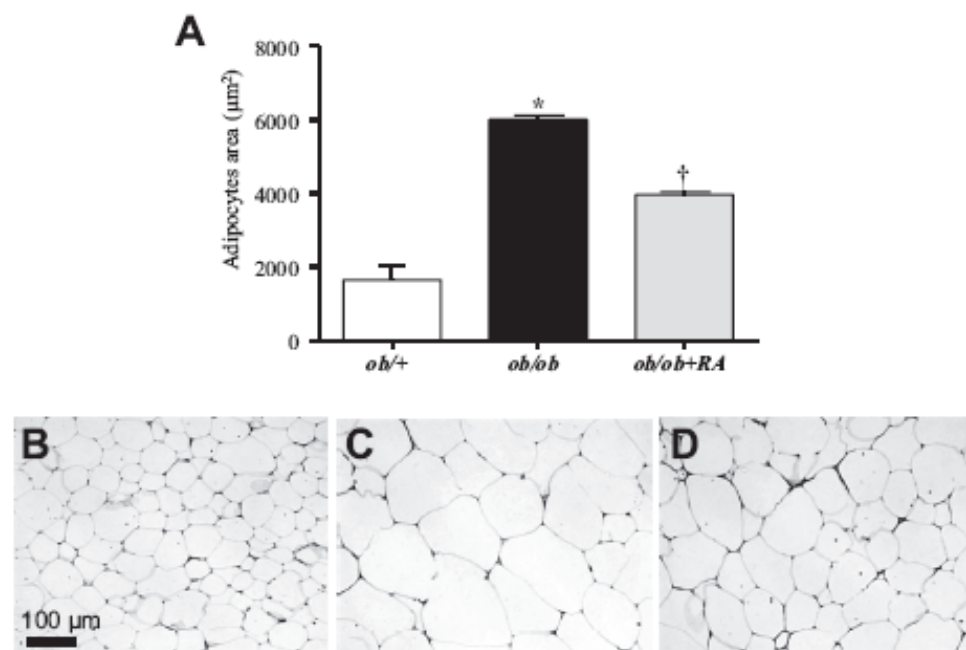


Figure 3

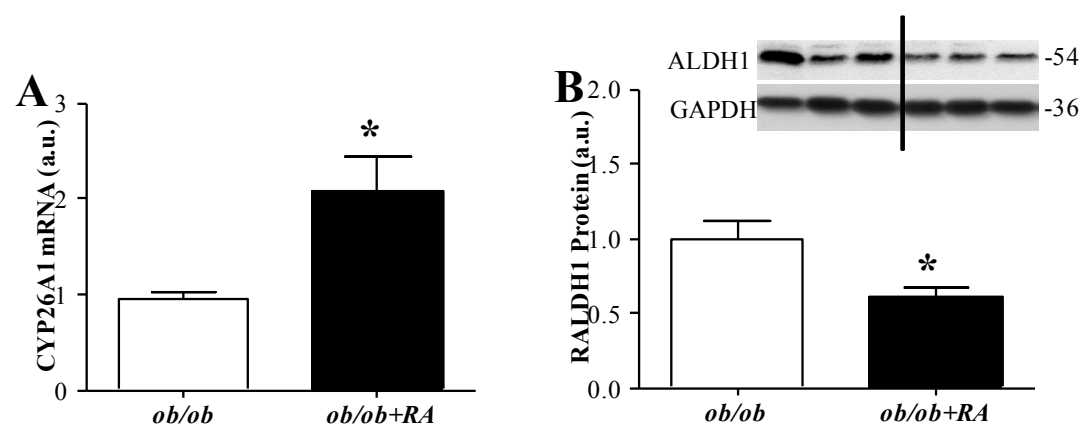


Figure 4

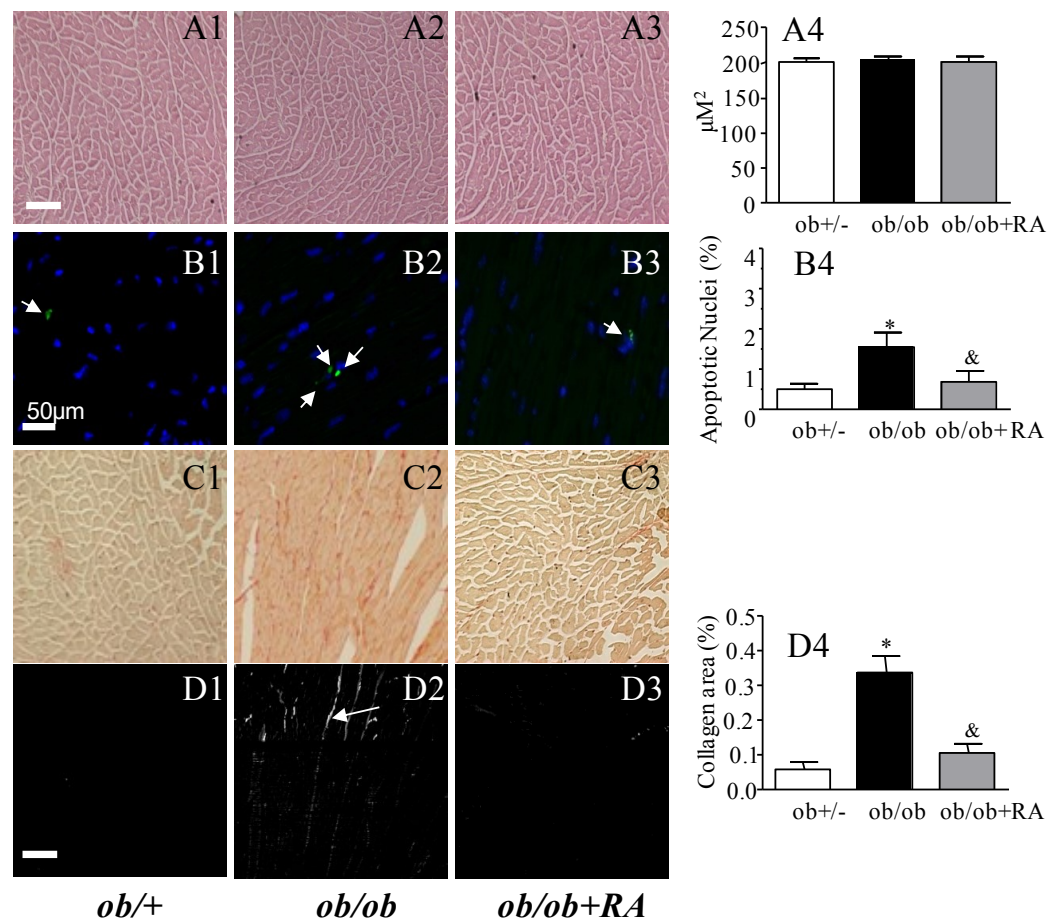


Figure 5

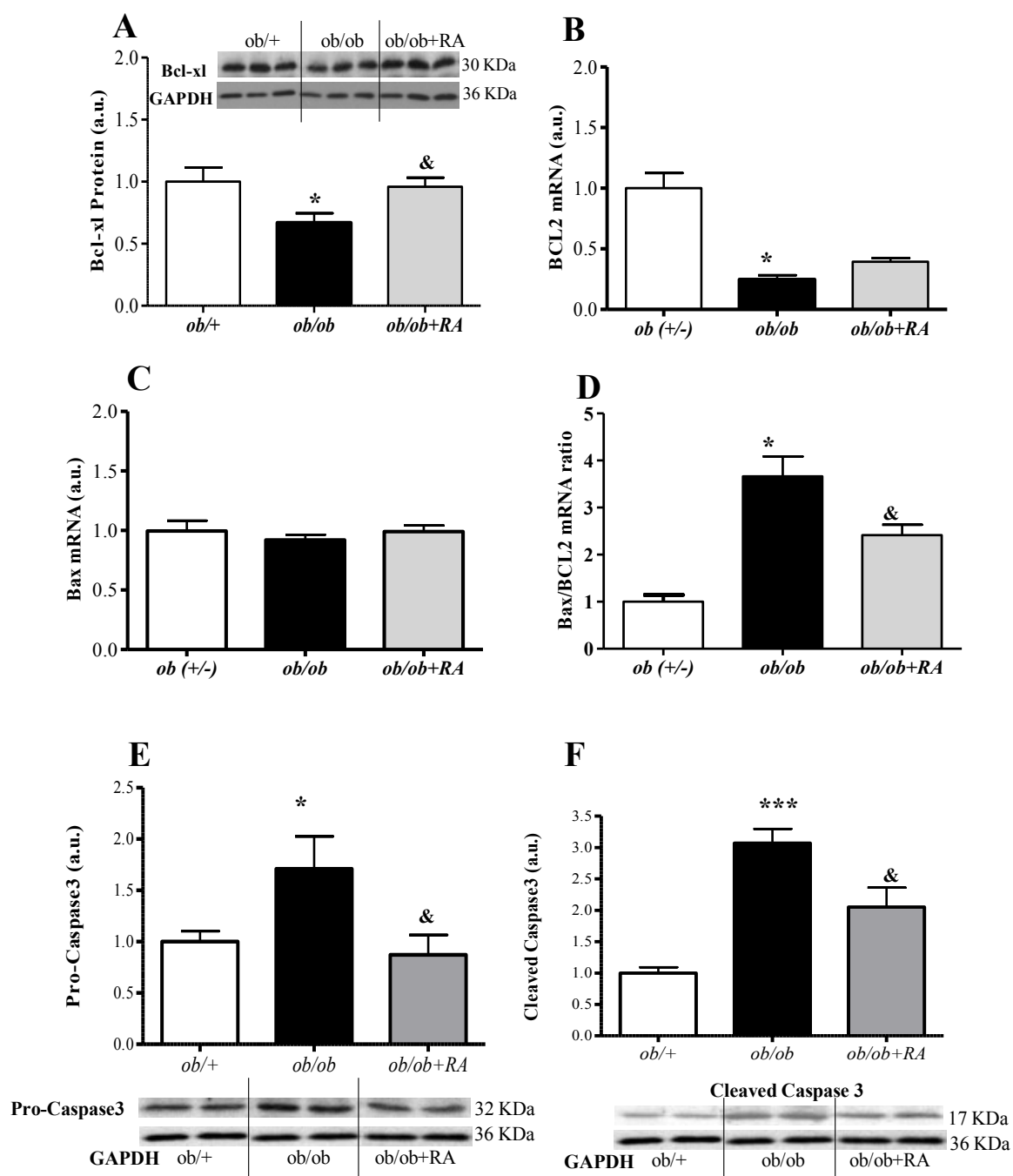


Figure 6

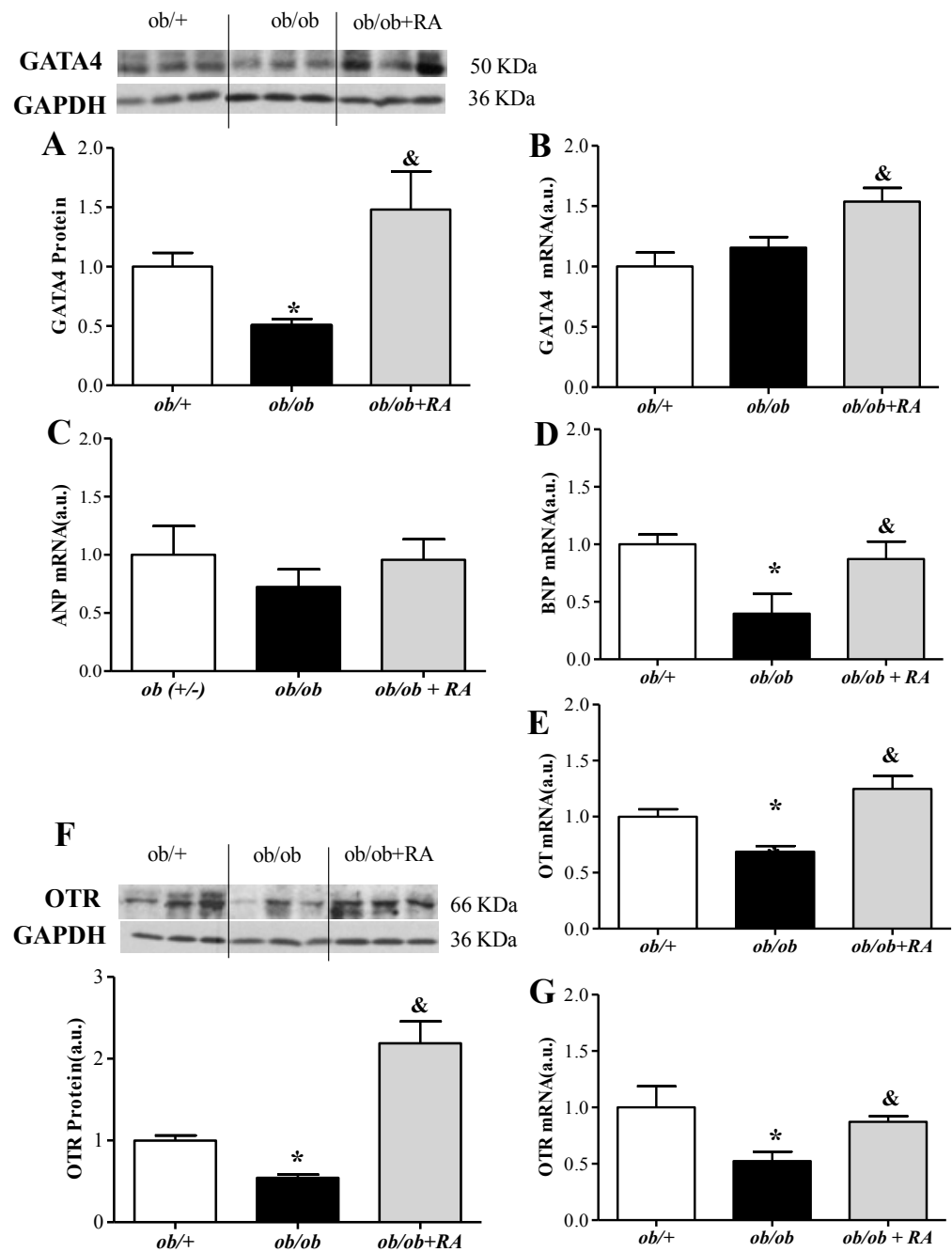


Figure 7.

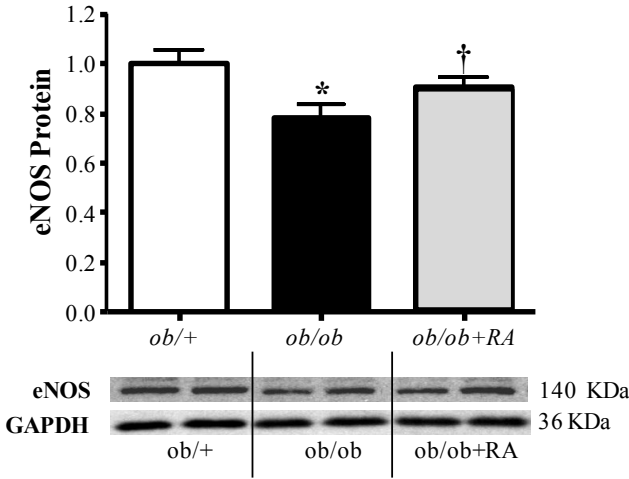
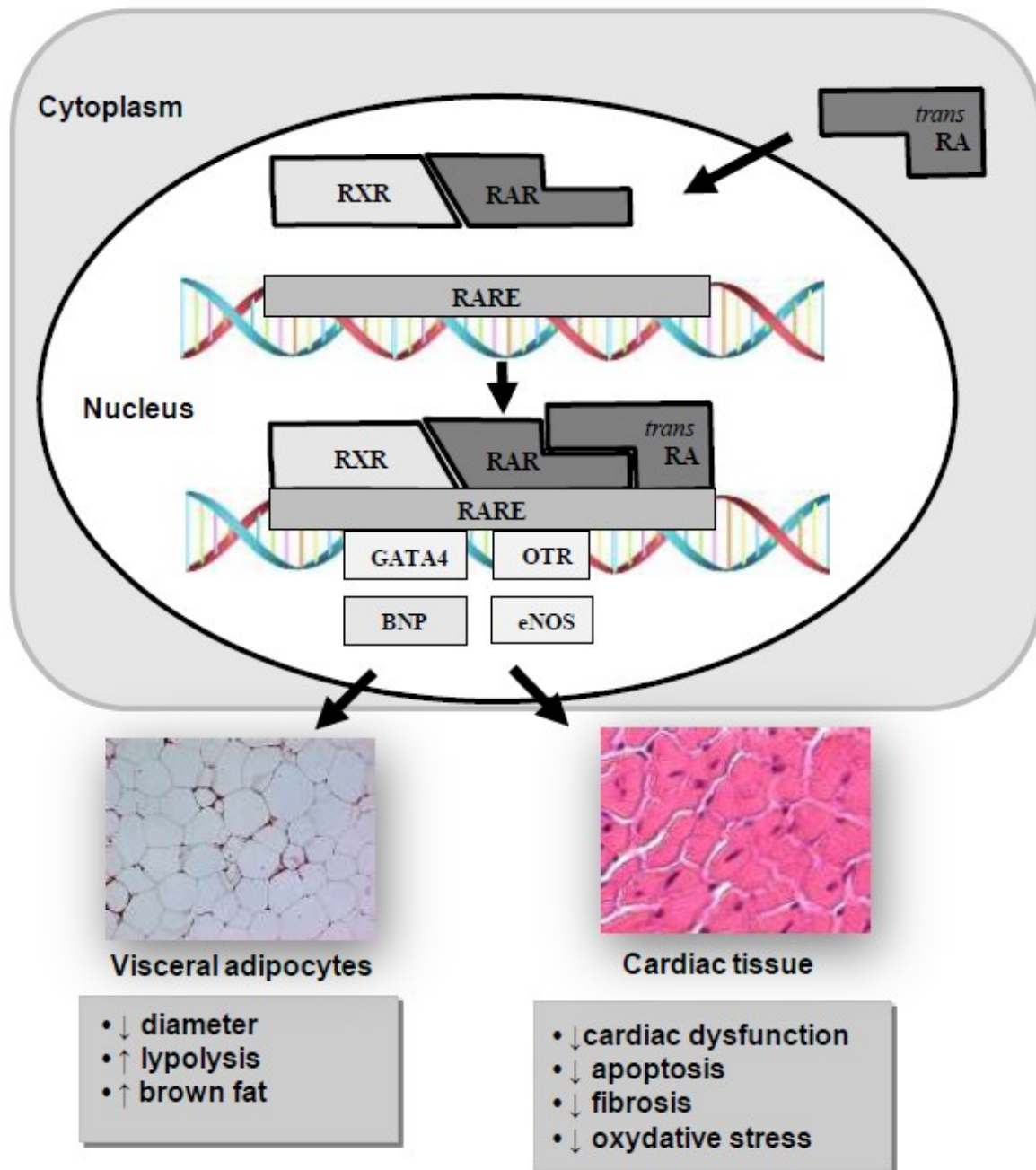


Figure 8



CHAPITRE 8 – Discussions et Conclusions

8.1. Discussion

8.2. L'AR diminue le poids corporel, la résistance à l'insuline, la glycémie et les niveaux sériques de ROL et de RBP4 chez les souris ob/ob

Nous avons investigué les effets de l'acide rétinoïque (AR) sur l'homéostasie du glucose dans les souris ob/ob, un modèle d'obésité, de résistance à l'insuline et d'hyperglycémie. De plus nous avons examiné la relation entre les concentrations sériques de rétinol (ROL) et son transporteur la RBP4 avec de la sensibilité à l'insuline. Les *ob/ob* sont des souris transgéniques totalement déficientes en leptine (*Lep* ^{-/-}). Ces souris présentent de l'obésité, une insulino-résistance, et de l'intolérance au glucose, phénotype qui ressemble au diabète de type 2 chez l'humain (Zhang Y. et al. 1994). Ces souris sont léthargiques et montrent également une réduction du métabolisme et de leur température corporelle (Klaus et al. 1998, Landsberg et al. 2009). Nous avons utilisé des souris *ob/ob* âgées de 9 à 10 semaines, parce qu'à cet âge, elles ont déjà développé de l'insulino-résistance et de l'hyperinsulinémie (Genuth et al. 1971). Les particularités, les avantages et les limites de ce modèle animal sont discutés très en détail dans le chapitre 4. Nos résultats ont clairement démontré que l'acide rétinoïque améliore de façon significative l'homéostasie du glucose. Les glycémies de base étaient significativement diminuées le 9^e jour du traitement et étaient maintenues ainsi jusqu'à la fin (jour 16) du traitement (Article 1, Fig.2), (Manolescu et al. 2010), indiquant l'effet bénéfique à long terme. De plus l'AR a significativement amélioré la tolérance au glucose et à l'insuline (article 1, Fig.3), (Manolescu et al. 2010). Plusieurs auteurs ont trouvé que la vitamine A est impliquée dans la régulation de l'adipogenèse, l'accumulation de la masse grasse et la balance énergétique (Bonet et al. 2003, Villarroya et al. 1999). Des souris mâles transgéniques (souche NMRI-*Naval Medical Research Institute*) supplémentées durant onze semaines en vitamine A (RE) avaient montré une tendance de perte de poids et de tissu adipeux (Felipe et al. 2004). En parallèle avec nos études, des souris mâles *wild-type* rendues obèses par une diète riche en gras, maigrissaient significativement lorsqu'une dose d'AR, double par rapport à la nôtre, leur était injectée en sous-cutané pendant cinq semaines (Berry and Noy 2009). Dans notre étude, l'administration orale d'une petite dose d'AR (2 µg/g poids corporel / jour) à des souris femelles transgéniques *lep* ^{-/-} obèses et diabétiques (souche *ob/ob*) pendant seulement seize jours était associée avec un poids

corporel de 7,4 % plus bas que celui des souris ob/ob non-traitées, à la fin (Article 1, Fig.1), (Manolescu et al. 2010). Les souris mangent d'un bon appétit, et aucun signe clinique (ex. : vomissements, dyspepsie, diarrhée, ballonnements, gaz) n'indique un quelconque risque de nourriture non-absorbée. Puisque l'apport alimentaire et l'activité locomotrice réflexe étaient similaires pour les souris ob/ob AR+ (traitées à l'AR) et les souris ob/ob AR- (non traitées), la perte de poids des souris traitées suggère une amélioration possible de leur métabolisme énergétique, probablement non-cinétique, statique (Manolescu et al 2010). Pour pouvoir dire exactement de combien de joules ou kcal à chaque jour, il faudrait la mesurer dans une cage métabolique. Leurs réflexes moteurs - qu'elles ne pourraient pas bloquer par la volonté - leur manquent, même sous stimuli interprétés par leur cerveau comme menaçant leur vie (suspension caudale). Alors il est évident - même sans cage métabolique, ni vidéo-caméra - qu'elles ne sont pas capables d'effort physique de grande intensité et/ou de longue durée. D'autre part, l'autopsie de ces animaux démontre une perte significative de masse adipeuse, ce qui est un indice physiologique et anatomique valide et une mesure indirecte de chaleur en même temps, sachant qu'en tout temps 1g de lipides vaut 9 kcal (1 kcal = 4,18kJ) sur la Terre, et que la graisse de nos souris ne peut faire exception.

Notre laboratoire avait préalablement démontré qu'un supplément d'AR dans la diète diminuait significativement les concentrations de ROL circulant chez des rats sains, probablement par un mécanisme de rétroaction sur l'axe métabolique de la vitamine A dans les tissus cibles (Bhat and Lacroix 1991a). Cela suggère une possibilité de diminution du taux de RBP4 circulante, avec effets bénéfiques pour la RI si appliquée à des animaux diabétiques. Parallèlement à nos recherches de 2008, il a été également démontré que l'administration d'une plus forte dose d'AR par voie sous-cutanée pendant quatre jours diminuait la production de l'adipokine RBP4, mais chez d'autres souris (NMRI) et mâles (Mercader et al. 2008). Cela suggère que la diminution des concentrations sériques de RBP4 chez nos souris ob/ob AR+ peut être tributaire, du moins en partie, de la diminution de synthèse et de sécrétion de RBP4 par les tissus adipeux. Parce que plusieurs études chez la souris et chez l'humain ont démontré une relation forte entre la concentration sérique de RBP4, l'obésité et le diabète de type 2, nous avons voulu vérifier si un traitement avec une petite dose d'AR sur une période de temps relativement courte (16 jours) diminuerait la RBP4 sérique et la résistance à l'insuline. Nos recherches démontrent pour la première fois que l'administration d'AR à petite dose chez des

souris ob/ob a eu comme effet de diminuer les concentrations sériques de ROL et de RBP4 ainsi que la résistance à l'insuline (Manolescu et al. 2010). Il est probable que les effets bénéfiques globaux de l'AR pour rééquilibrer l'homéostasie du glucose, sont dus non seulement à la baisse des concentrations sériques de RBP4, mais également à l'activation des gènes impliqués dans l'action de l'insuline, via des récepteurs nucléaires sensibles à l'AR tels que RAR, RXR ou PPAR (Haffner et al. 2004, Scribner et al. 2007). Cette hypothèse serait compatible avec l'observation que les diminutions de l'obésité et de la résistance à l'insuline, lors de traitements à l'AR, seraient associées à l'activation de récepteurs nucléaires tels que les RAR et PPAR β/δ (Berry and Noy 2009). Il semblerait que diminuer seulement la concentration sérique de RBP4, ne serait pas suffisant pour diminuer la résistance à l'insuline chez la souris. En effet, le traitement avec l'A1120, une molécule artificielle non-rétinoïde avec grande affinité pour la RBP4, induit une dissociation entre TTR et RBP4 avec comme conséquence l'élimination de RBP4 par le rein, donc la diminution de sa concentration sanguine (Mercader et al. 2008). Cependant, dans ce contexte (A1120) il n'y a pas eu diminution de la résistance à l'insuline. Par contre un rétinol analogue, la fenrétinide, qui diminue la RBP4 circulante, diminue aussi la résistance à l'insuline, ce qui suggère l'implication de mécanismes complémentaires possiblement reliés aux rétinolides (Motani et al. 2009, Yang et al. 2005). Il est donc suggéré que la diminution du taux de la RBP4 sérique soit nécessaire, mais pas toujours suffisante pour induire une diminution de la résistance à l'insuline. Des mécanismes complémentaires qui accompagnent la diminution de la RBP4 sanguine seraient ainsi reliés, et au métabolisme des rétinolides, et à l'amélioration de l'homéostasie du glucose. Également, la concentration sanguine élevée de la RBP4 dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, suggère que le métabolisme de la vitamine A est également perturbé dans ces états pathologiques. Toutefois, il y a peu de données à ce sujet, par exemple pour savoir si les niveaux circulants de ROL sont également augmentés subséquentement à l'augmentation de la RBP4 sanguine. Théoriquement, le rétinol devrait circuler dans le sang lié à la RBP4 de façon équimolaire (1:1) mais des études ont démontré qu'une petite quantité de ROL non lié à la RBP4 circule aussi (Biesalski et al. 1999, Quadro L. et al. 1999). Donc même si théoriquement le ratio normal ROL/RBP4 est de 1:1 dans le sang, en pratique les mesures indiquent un ratio ROL/RBP4 légèrement >1, à cause du ROL libre. Ainsi, l'équipe de Motani a trouvé un ratio ROL/RBP4 de 1,78 chez des souris minces et en santé, ce qui est légèrement plus grand que ce

que nous avons trouvé (ROL/RBP4=1,38) dans le même type de souris (Motani et al. 2009). D'autres ont trouvé une association entre le ratio sérique de ROL/RBP4 et l'obésité ou encore le diabète de type 2 (Aeberli et al. 2007, Erikstrup et al. 2009, Mills et al. 2008). Ils ont suggéré que le ratio sanguin ROL/RBP4 serait un meilleur indicateur pour le diabète de type 2, que la RBP4 seule. Dans nos études, nous avons observé une augmentation significative du ratio ROL/RBP4 sanguin chez les souris obèses diabétiques non traitées (ob/ob RA-), comparativement aux souris minces en santé (Article 1, Fig.4). Le traitement à l'acide rétinoïque a diminué ce ratio de 20% chez les souris obèses diabétiques ob/ob RA+ (Article 1, Fig.4) (Manolescu et al. 2010). Puisqu'une diminution du ratio sérique de ROL/RBP4 coïncide avec une amélioration significative de la tolérance à l'insuline et de la tolérance au glucose chez les souris traitées (ob/ob RA+), il serait intéressant de mesurer ce ratio chez des malades qui utilisent un autre traitement (ex.: metformine) pour améliorer leur index glycémique. Il n'est pas clair si l'excès en grande quantité de ROL libre dans le sérum contribue à la pathogenèse du diabète de type 2. Cependant le traitement à l'AR diminue significativement cet excès de ROL libre chez les souris ob/ob RA+ (Manolescu et al. 2010). D'autres études ont trouvé un ratio ROL/RBP4 plus grand dans le liquide céphalo-rachidien que dans le sérum des participants avec hypertension intracrânienne idiopathique, suggérant une implication du ROL libre dans la pathogenèse de l'hypertension intracrânienne (Libien and Blaner 2007, Warner et al. 2007). Notre travail démontre qu'un traitement avec une petite dose d'AR, diminue la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, l'hyperglycémie, le poids corporel et les concentrations circulantes de ROL et RBP4 chez des souris ob/ob, obèses et diabétiques.

8.3. L'acide rétinoïque diminue l'obésité et améliore les métabolismes de la vitamine A et énergétique chez la souris diabétique ob/ob

Nous avons démontré chez la souris ob/ob qu'un traitement à petite dose d'AR diminue la glycémie, la résistance à l'insuline, le ROL et la RBP4 circulants ainsi que le poids corporel, malgré un apport alimentaire semblable aux souris ob/ob non traitées (Manolescu et al. 2010). Nous avons également observé que l'AR diminue le gras viscéral (VF) chez les souris ob/ob (Manolescu et al. 2014). Dans l'ensemble avec d'autres études, nos observations suggèrent que l'AR influence le métabolisme de la vitamine A, du glucose et des lipides (Brun et al. 2013). Il a également été observé que le métabolisme énergétique augmenté était associé à une induction

de gras brun et/ou beige, sous l'influence des rétinoïdes (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013, Villarroya et al. 2004).

Il est donc postulé que tous ces effets puissent être reliés à l'effet du traitement à l'AR sur des gènes du métabolisme de la vitamine A et du métabolisme de l'énergie, métabolismes qui sont perturbés dans l'obésité et le diabète de type 2. Nous avons effectivement trouvé que le traitement à l'AR chez la souris ob/ob modulait l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A de manière tissu spécifique (SF, VF, SM, LIV). Chez la souris ob/ob, le traitement à l'AR normalise les concentrations de vitamine A dans le SF (ROL), le VF (ROL), les SM (ROL, RE), le LIV (RE) et celles de la RBP4 dans les SF et VF et le LIV, par rapport aux souris minces et en santé. Dans les SF et VF, nous avons observé une augmentation de l'expression (mRNA) des gènes *PGC1 α* et *UCP1*, qui sont impliqués dans la genèse mitochondriale (Austin and St-Pierre 2012) et le métabolisme du gras beige/brun (Chen H. Y. et al. 2013). Enfin nous avons également observé que notre traitement à l'AR était associé à une diminution de la taille des adipocytes (Art. 2, Fig. 5A; B et Fig. 6B) (Manolescu et al. 2014).

8.3.1. L'AR influence les gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, chez les souris ob/ob, de manière tissu spécifique

L'obésité et la résistance à l'insuline sont associées à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Bastard et al. 2000a, Bastard et al. 2000b) et une accumulation de macrophages dans le tissu adipeux (Weisberg et al. 2003) perturbant l'activité de plusieurs voies de signalisation y compris celles impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et de leurs récepteurs nucléaires (Frey and Vogel 2011, Villarroya et al. 1999, Villarroya et al. 2004). Plusieurs de ces voies sont également sensibles à l'action de l'AR dans les tissus adipeux (Berry et al. 2012b, Frey and Vogel 2011, Villarroya et al. 2004). Les profils d'expression de gènes du métabolisme des rétinoïdes en contexte d'obésité et diabète avec ou sans diverses doses exogènes d'AR, n'avaient pas été explorés de façon exhaustive. Nos observations depuis 2008 chez la souris ob/ob démontrent que notre traitement à petite dose d'AR module les gènes du métabolisme de la vitamine A impliqués dans l'absorption (*STRA6*), le transport (*RBP4*, *CRBP*, *CRABP*), le dépôt (*LRAT*), l'oxydation (*RDH*, *RALDH*), le catabolisme (*CYP26A1* et *CYP26B1*) et les récepteurs nucléaires (*RAR*, *RXR*) dans les SF et VF, dans les muscles et dans

le foie (Article 2, Fig.1). Un schéma métabolique est illustré dans l'article 2 (Fig.6A). Les souris normales sont les témoins de référence santé.

STRA6. Le récepteur cellulaire membranaire STRA6, facilite l'entrée du ROL sérique (apporté par le complexe ROL-RBP4) dans le cytoplasme (Blaner WS 2007, Kawaguchi et al. 2007), mais peut également fonctionner de façon bidirectionnelle en libérant de petites quantités de ROL dans la circulation (Berry et al. 2012c, Isken et al. 2008). Les concentrations de la protéine STRA6 augmentent avec la progression de l'adipogenèse à partir du stade de pré-adipocytes jusqu'au stade d'adipocytes adultes, et sont soumises à plusieurs régulations dont une au niveau post-traductionnel (Muenzner et al. 2013, Wu J. et al. 2014, Zemaný et al. 2014). Dans notre étude, l'expression de STRA6 était indétectable dans le foie (LIV) et réduite dans les muscles squelettiques (SM) en conformité avec la littérature (Bouillet et al. 1997, Muenzner et al. 2013, Pasutto et al. 2007, Szeto W. et al. 2001). Puisque le foie récupère la vitamine A de chylomicrons circulants, l'absence ou l'expression réduite du STRA6 dans le foie est logique, pour empêcher ainsi la réabsorption de son propre ROL, libéré sous forme de complexes ROL-RBP4 (Kawaguchi et al. 2007). Par contre, l'expression de STRA6 était élevée dans le gras sous-cutané (SF) et le gras viscéral (VF) de souris ob/ob, comparativement aux souris minces témoins en santé, en conformité avec d'autres observations (Berry and Noy 2012, Muenzner et al. 2013). Notre traitement à l'AR a normalisé l'expression (mRNA) du STRA6 dans le VF et l'a augmenté davantage dans le SF. Ceci a probablement contribué, en partie, à la normalisation de la concentration de ROL dans les tissus adipeux (Article 2 ; Fig.2A et 2B), donc à l'amélioration de l'homéostasie cellulaire de la vitamine A. Nous avons donc des associations intéressantes des profils de transcription (mRNA) du STRA6 (porteur du ROL) avec l'obésité-diabète avant- et avec les améliorations après- notre traitement à l'AR. Nos résultats sont compatibles avec d'autres publications démontrant l'implication du STRA6 dans l'adipogenèse via le métabolisme des rétinoïdes, soit en relation avec le ROL, la RBP4, la LRAT et les RAR (Berry et al. 2011, Isken et al. 2008, Zemaný L et al. 2014).

RBP4. Nous avons observé que l'expression (mRNA) de l'adipokine et du transporteur de ROL, la RBP4, était élevée dans les SF et VF ainsi que dans le foie des souris ob/ob, comparativement aux souris minces témoins en santé. Le traitement avec de l'AR, a réduit significativement la transcription de la RBP4 dans le SF, avec une tendance à la baisse dans le VF aussi (Article 2, Fig.1A et B). Cela suggère que la baisse du taux sanguin de RBP4

(Manolescu et al. 2010) est la conséquence, du moins en partie, d'une synthèse et d'une sécrétion diminuées de la RBP4 des tissus adipeux (Yang et al. 2005). Ce serait conforme avec l'observation d'une synthèse (mRNA) diminuée de l'adipokine RBP4, chez des souris traitées avec de l'AR par voie sous-cutanée pendant quatre jours (Mercader et al. 2008). Toutefois, la majorité de la RBP4 sérique provient du foie, qui contribue probablement aussi à l'augmenter en circulation, tel qu'elle est retrouvée chez des souris obèses et insulino-résistantes (Berry and Noy 2012, Yang et al. 2005) et chez des patients diabétiques (Christou et al. 2012, Graham TE et al. 2006b, Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010).

CRBP1. Notre traitement à l'AR augmente l'expression (mRNA) du transporteur intracellulaire des rétinoïdes, le CRBP1, dans les quatre tissus étudiés (Article 2, Fig.1). Le CRBP1 lie le ROL et facilite son estérification en RE, sous l'action catalytique des enzymes LRAT et/ou ARAT (D'Ambrosio et al. 2011). Il peut aussi lier le RAL pour l'oxydation spécifique en AR (Noy 2000). Le CRBP1 protège le ROL contre la dégradation oxydative aléatoire ou contre l'isomérisation (Ross AC 1993a, b), augmentant l'efficacité de sa transformation enzymatique en RE (Napoli JL 2000) ou en RAL et, subséquentement, en AR (Blomhoff and Blomhoff 2006). *In vitro*, l'inhibition du CRBP1 est associée à une augmentation de la différenciation cellulaire des préadipocytes 3T3-L1 et des fibroblastes d'embryon de souris (Zizola et al. 2010). Le CRBP1 peut également inhiber la différenciation cellulaire des préadipocytes (Frey and Vogel 2011) et la diminution ou l'inhibition de l'expression (mRNA) du CRBP1 augmente l'adipogenèse (Zizola et al. 2010). En plus, les souris CRBP1/KO présentent un métabolisme hépatique de la vitamine A accéléré, qui mène à une diminution de 50% des réserves hépatiques de RE (Matt et al. 2005). L'équipe de Frey et Vogel a démontré que des niveaux élevés de CRBP1 diminuent l'adipogenèse et la taille des adipocytes et en conséquence améliorent la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose pour le même IMC (Frey and Vogel 2011) tout en augmentant les réserves hépatiques de RE (Matt et al. 2005). En accord avec ces observations, le traitement à l'AR chez nos souris ob/ob a normalisé les taux hépatiques de RE (Article 2, Fig.2D), réduit le diamètre des adipocytes (Article 2; Fig.5) et (Manolescu et al. 2014) et diminué l'insulino-résistance et la glycémie (Manolescu et al. 2010).

LRAT. La lécithine-rétinol acyltransférase est la principale enzyme d'estérification du ROL (Li Y. et al. 2014). Elle est aussi impliquée dans la signalisation cellulaire avec la RBP4 et le STRA6 (Marwarha et al. 2014). En complémentarité avec le principal dépôt de RE dans le

foie, le tissu adipeux peut stocker jusqu'à 20% des réserves globales de rétinoïdes (Tsutsumi et al. 1992). Nous avons trouvé la LRAT élevée (mRNA) dans le foie et les tissus adipeux (SF et VF), alors que diminuée dans les muscles des souris ob/ob comparativement aux souris minces et en santé. Le traitement avec de l'AR module vers la normalisation l'expression de LRAT des souris ob/ob, dans les muscles et le foie. Il a également augmenté l'expression de LRAT dans le VF (Article 2, Fig.1). Ceci pourrait expliquer l'accumulation de RE que nous avons observée dans les deux tissus adipeux des souris ob/ob (Article 2, Fig.2). Les dépôts adipeux de rétinoïdes (RE) sont utilisés comme source de vitamine A, en cas d'épuisement des réserves hépatiques de RE (O'Byrne SM et al. 2005). Dans la présente étude nous avons trouvé les réserves hépatiques de RE diminuées chez les souris ob/ob (Article 2, Fig.2D). La sécrétion hépatique de vitamine A, l'absorption directe de RE circulants par les tissus (Article 2, Fig.6A) et l'activité des enzymes d'estérification (ex. : LRAT, ARAT) influencent la dynamique et le stockage tissulaire de RE (Orland et al. 2005)

RDH10 Les besoins des adipocytes en ROL sont comblés par le complexe ROL-RBP4-TTR circulant, ainsi que par l'hydrolyse de leurs réserves intracellulaires de RE. Comparativement aux souris minces en santé, le traitement de souris ob/ob avec de l'AR a normalisé l'expression du RDH10 dans le SF ainsi que dans le foie, tout en l'augmentant davantage dans le VF (Article 2, Fig. 1). Cette oxydoréductase de la famille RDH/SDR est très importante; elle conserve 98,6% de l'homologie pour la séquence des acides aminés, entre la souris et l'humain (Wu B. X. et al. 2002). La RDH10, comme les autres RDH, fonctionne conjointement avec des enzymes spécifiques en co-substrats (NAD et NADP), et oxyde (NAD⁺ vers NADH) le ROL en rétinaldéhyde (RAL) ou réduit (NADPH to NADP⁺) le RAL en ROL (Article 2, Fig.6A). La RDH10 est spécifique pour le *at*-ROL (Parés et al. 2008) et est importante pour la vision et l'embryogenèse, ainsi que pour le métabolisme énergétique, étant associée à la membrane mitochondriale et/ou les vacuoles lipidiques (Jiang and Napoli 2013). La RDH10 influence donc, du moins en partie, les concentrations de ROL dans les tissus adipeux. Dans notre présente étude, ses profils d'expression (mRNA) sont associés à la normalisation des concentrations de ROL dans les gras SF et VF suite au traitement à l'AR (Article 2, Fig.2A et 2B). Elle contribue probablement, en partie, à cette normalisation.

RALDH. Ces enzymes catalysent la synthèse endogène d'AR dans les tissus (Reichert et al. 2011). L'expression réduite de la RALDH1 observée dans le SF et l'expression réduite de

la RALDH2 observée dans le gras VF et les muscles des souris ob/ob traitées avec de l'AR, peuvent s'expliquer par un mécanisme de rétroaction induit par notre AR exogène. D'un autre côté, le traitement avec de l'AR, augmente l'expression (mRNA) de la RALDH1 dans le VF et de la RALDH2 dans le SF et augmente l'expression des ces deux enzymes dans le foie (Article 2, Fig.1). Cela serait compatible avec d'autres observations qui ont aussi trouvé des différences spécifiques entre des transcrits de RALDH, avec une plus grande expression de la RALDH1 dans des préadipocytes du VF que dans des préadipocytes du SF (Gesta et al. 2006). Ceci n'a pas toujours été confirmé au niveau protéique (Peinado et al. 2010). De plus, dans le tissu adipeux des souris matures, on observe un plus grand niveau protéique de RALDH1 dans le SF que dans le VF (Sima et al. 2011). Une augmentation de la RALDH2 a été observé dans la fraction vasculaire stromale (SVF) du VF autant au niveau d'expression (mRNA) qu'au niveau protéique (Peinado et al. 2010). Il est donc possible que dans certaines circonstances les préadipocytes du gras VF produisent plus d'AR endogène que les préadipocytes du gras SF (Peinado et al. 2010) et interagissent de manière différente avec l'AR exogène, pour réguler l'adipogenèse (Bonet et al. 2003). Lorsqu'il y a une corrélation inverse entre le niveau des transcrits et celui des protéines des RALDH, cela suggère des régulations post-traductionnelles, tel qu'observé pour d'autres protéines (ex.STRA6) (Muenzner et al. 2013). Le traitement à l'AR de souris C57/BL6 (souche utilisée pour créer des ob/ob transgéniques) augmente l'expression de la RALDH2 et est associé à une histologie normale du foie (Liu et al. 2014). En plus l'AR exogène réduit les transcrits de RALDH1 et diminue l'adipogenèse et l'accumulation de gras (Reichert et al. 2011, Ziouzenkova O et al. 2007a). Dans notre étude, un phénomène similaire pourrait expliquer, du moins en partie, la taille réduite des adipocytes du SF des souris ob/ob traitées avec de l'AR (Article 2, Fig.5A).

CRABP. Notre traitement de souris ob/ob à l'AR a normalisé - comparativement aux souris minces, témoins en santé- l'expression (mRNA) de la première protéine de transport cellulaire d'AR (CRABP1), dans tous les tissus (SF, VF, SM, LIV) des souris ob/ob (Article 2, Fig.1). Notre traitement à l'AR a normalisé l'expression (mRNA) de la CRABP2 (protéine 2 de transport cellulaire d'AR) seulement dans le foie (LIV) des souris ob/ob (Article 2, Fig.1D) et a augmenté davantage l'expression de la deuxième protéine de transport cellulaire d'AR (CRABP2) dans le VF des souris ob/ob (Article 2, Fig.1B). D'autres ont confirmé qu'un traitement avec de l'AR peut augmenter l'expression de la CRABP2, ce qui contribue à

diminuer l'obésité par l'inhibition de la différenciation des préadipocytes (Berry et al. 2012b, Berry and Noy 2009, Berry et al. 2010). Cela pourrait expliquer, en partie, notre observation que le traitement à l'AR réduisait la taille des adipocytes dans le VF des souris ob/ob (Article 2, Fig. 5B), (Manolescu et al. 2014). Le rôle principal des CRABP1 et CRABP2 est de transférer l'AR dans le noyau, pour activer ses récepteurs nucléaires RAR et RXR (Chambon P 2005). La fine régulation des quantités d'AR qui accèdent au noyau par les CRABP1 et CRABP2 y prévient les effets nocifs d'un excès d'AR (Maden M. et al. 1988). Les CRABP1 et CRABP2 guident également l'AR vers son catabolisme une fois son action biologique accomplie (Boylan J. F. and Gudas 1992b, Stachurska et al. 2011). Ce catabolisme cellulaire d'AR est accompli par les cytochromes CYP26A1/B1 (Giguère 1994, Napoli JL et al. 1991) et un peu par les mitochondries (Ruff and Ong 2000).

CYP26. Le traitement à l'AR a sensiblement augmenté les transcrits (mRNA) des enzymes cataboliques CYP26A1 dans le SF, les SM et le LIV et celui de CYP26B1 dans le VF, les SM et le LIV (Article 2, Fig.1), suggérant une augmentation du catabolisme de tout excès d'AR (ici en partie d'origine exogène) en des métabolites polaires pour élimination par les reins dans l'urine (Frolik et al. 1979).

RAR ; RXR Le traitement à l'AR chez la souris ob/ob a augmenté l'expression du récepteur nucléaire RAR dans le SF et diminué celle du récepteur RXR dans les SF et VF (Article 2, Fig.1). Ces profils «en ciseaux» haut-RAR et bas-RXR sont reconnus pour inhiber l'adipogenèse et la différenciation des préadipocytes et pour réduire la différenciation des adipocytes adultes, contribuant ainsi à réduire les dépôts de gras (Berry et al. 2012b, Berry and Noy 2009, Berry et al. 2010, Ziouzenkova O. et al. 2007b). Cela est compatible avec notre observation que l'AR a diminué significativement la taille des adipocytes dans le SF et le VF (Article 2, Fig. 5), (Manolescu et al. 2014).

8.3.2. L'acide rétinol normalise les taux tissulaires de vitamine A (ROL et RE)

Chez les souris ob/ob, la réserve hépatique de vitamine A (RE) était basse (Article 2, Fig.2D) alors que les concentrations de ROL et de RE étaient élevées dans le SF, le VF et dans les muscles, comparativement aux souris témoins en santé (Article2, Fig. 2). Ces concentrations élevées de vitamine A dans le SF, le VF et les SM, suggèrent une absorption augmentée de vitamine A de la circulation et/ou un métabolisme cellulaire de la vitamine A ralenti (Article 2,

Fig.6A). Les concentrations diminuées de RE dans le foie de souris ob/ob suggèrent une hydrolyse augmentée des RE, associée à une plus grande sécrétion du complexe hépatique ROL-RBP4 dans le sang. Cela expliquerait les concentrations sériques élevées de ROL et RBP4 associées à l'obésité et la résistance à l'insuline (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005). Plusieurs études chez l'animal et chez l'humain ont démontré un ralentissement du métabolisme de la vitamine A dans le diabète (Rhee and Plutzky 2012). Chez des rats diabétiques, la disponibilité métabolique de la vitamine A est réduite (Tuitoe et al. 1996). Il semblerait que dans des conditions de résistance à l'insuline et de diabète, il y a une demande augmentée pour la vitamine A par les tissus périphériques, ce qui engendre une baisse des réserves de vitamine A (RE) dans le foie. Chez l'humain, des niveaux circulants élevés de RE ont également été observés chez des patients diabétiques comparativement à des sujets normaux (Wako et al. 1986). Il serait donc possible que la diminution des réserves de vitamine A (RE) dans le foie des souris ob/ob soit aussi due, en partie, à une sécrétion directe de RE dans le sang, en plus d'une sécrétion augmentée du complexe ROL-RBP4 par le foie. Dans notre laboratoire il avait été démontré qu'un traitement à l'acide rétinoïque réduit le niveau de ROL sérique et rétablit les réserves endogènes de vitamine A (RE) dans le foie (Bhat and Lacroix 1986). Dans notre présente étude, les réserves diminuées de RE dans le foie des souris ob/ob se sont normalisées après traitement avec de l'AR (Article 2, Fig. 2D, Tableau 4). Cela est probablement dû à une diminution de besoins en vitamine A de tissus périphériques, puisque directement fournies par l'AR exogène. Cela aurait comme conséquence une diminution de la sécrétion hépatique du complexe ROL-RBP4 dans la circulation et donc une diminution de l'hydrolyse des RE dans le foie, permettant ainsi la reconstitution des réserves de RE hépatiques. Cela expliquerait la baisse des niveaux sériques de ROL et de RBP4 des souris ob/ob traitées avec de l'AR (Manolescu et al. 2010). Notre traitement à l'AR a amélioré l'homéostasie de la vitamine A, normalisant les concentrations de ROL dans les gras (SF ; VF) et les muscles (Article 2, Fig. 2 A, B, C; Tableau 4). Ce traitement à l'AR a aussi normalisé les réserves de RE dans les muscles et dans le foie (Article 2, Fig. 2 C, D; Tableau 4), tout en les augmentant dans le SF et le VF (Art. 2, Fig. 2 A, B; Tableau 4) (Manolescu et al. 2013, 2015)

8.3.3. L'acide rétinol normalise les taux de RBP4 du tissu adipeux et du foie

Chez la souris ob/ob, nous avons observé des concentrations de RBP4 diminuées dans les tissus adipeux (SF, VF) et le foie comparativement aux souris témoins minces en santé (Article 2, Fig.3). Cela suggère une augmentation de la sécrétion hépatique du complexe ROL-RBP4 dans le sang, mais également une augmentation de la sécrétion dans la circulation de l'adipokine RBP4 provenant du SF et du VF. Les deux sources contribuent ainsi aux niveaux élevés de RBP4 sériques observés dans l'obésité et le diabète (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005). Le traitement à l'AR a augmenté les concentrations tissulaires de RBP4 dans le SF, le VF et dans le foie de souris ob/ob, près des valeurs normales de souris en santé (Article 2, Fig.3, Tableau 4). Cela est probablement dû à la diminution de la sécrétion dans le sang du complexe ROL-RBP4 hépatique et de l'adipokine RBP4 des tissus adipeux. Ceci est en accord avec nos observations démontrant que le traitement à l'AR diminuait les niveaux sériques de ROL et de RBP4 (Tableau 4), et la RI chez des souris ob/ob (Manolescu et al. 2010). De plus, le traitement à l'AR diminuait l'expression (mRNA) de la RBP4 dans les tissus adipeux, suggérant que la réduction de la RBP4 circulante est tributaire d'une synthèse et d'une sécrétion réduites de l'adipokine RBP4 (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005).

Manolescu DC 2016		SF	VF	Sang	SM	LIV
Souris minces en santé	ROL (pmol/mg)	1.56 ± 0.07	1.70 ± 0.06	1.85	0.22 ± 0.03	10.72 ± 1.65
	RE (pmol/mg)	1.16 ± 0.10	1.02 ± 0.12		0.19 ± 0.03	609.96 ± 30.16
	RBP4 (pmol/mg)	0.95 ± 0.05	3.24 ± 0.44	1.18		7.15 ± 0.61
ob/ob	ROL (pmol/mg)	2.69 ± 0.10	2.31 ± 0.06	5.90	1.02 ± 0.09	11.41 ± 1.43
	RE (pmol/mg)	2.95 ± 0.34	3.30 ± 0.24		0.40 ± 0.08	403.77 ± 27.55
	RBP4 (pmol/mg)	0.33 ± 0.05	0.77 ± 0.17	2.43		3.98 ± 0.66
ob/ob + RA	ROL (pmol/mg)	1.72 ± 0.06	1.84 ± 0.07	4.22	0.63 ± 0.03	12.13 ± 1.56
	RE (pmol/mg)	5.71 ± 0.31	4.36 ± 0.30		0.18 ± 0.02	613.29 ± 30.37
	RBP4 (pmol/mg)	0.75 ± 0.13	2.25 ± 0.28	2.12		7.68 ± 1.18

Tableau 4 : Dynamique de la vitamine A et RBP4 dans le sang et tissus des souris témoins minces et en santé, ob/ob et ob/ob + RA. Normalisations après traitement à l'AR. Chiffres compilés des Article 1 (Manolescu et al. 2010), Article 2 et (Manolescu et al 2013,2015)

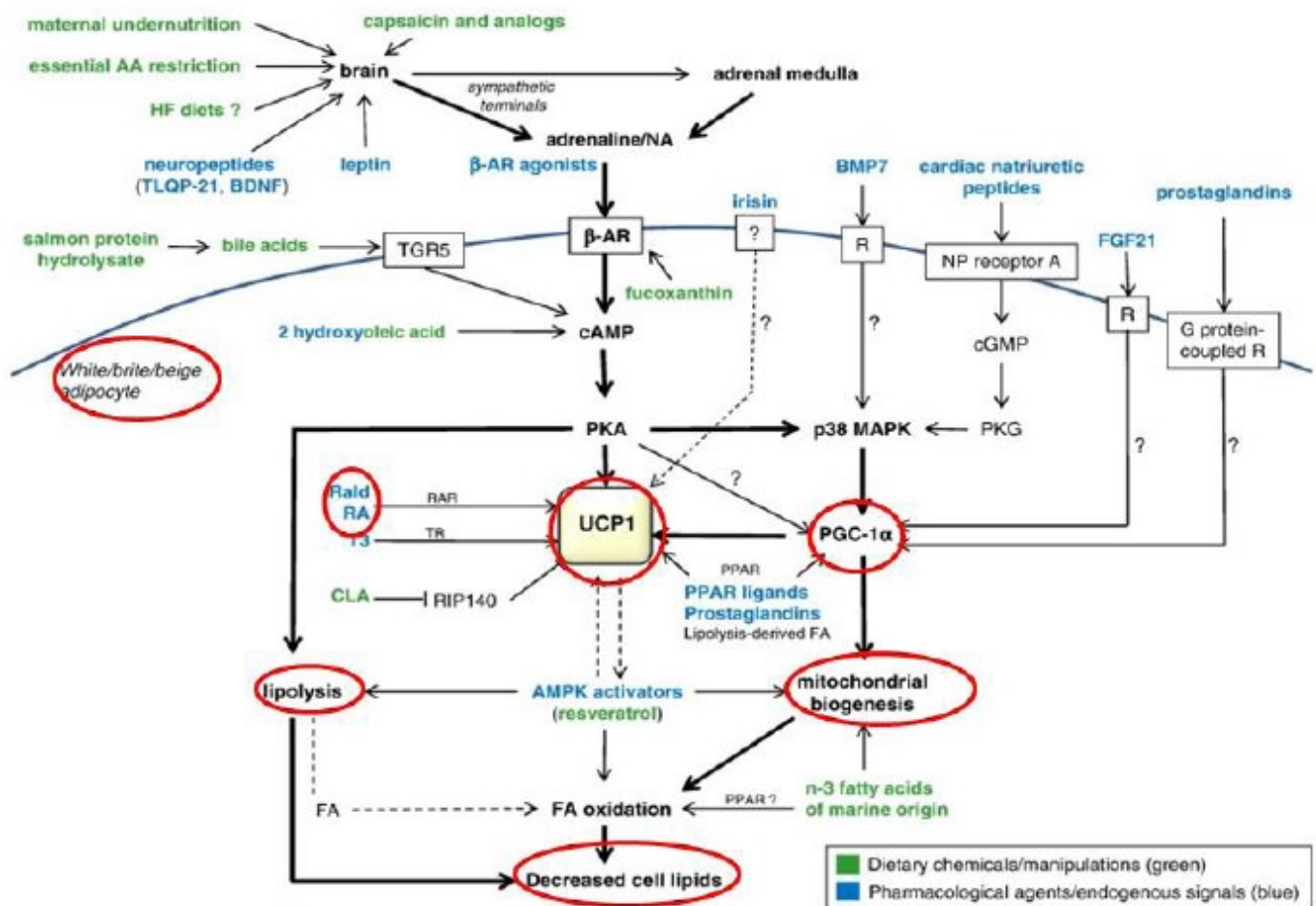
8.3.4. L'AR réduit l'hypertrophie adipocytaire dans les tissus adipeux SF et VF

Nos études chez la souris ob/ob ont démontré que le traitement à l'acide rétinoïque était associé à une baisse de 7,4 % du poids corporel chez les souris traitées comparativement aux souris non-traitées, après seize jours, (Manolescu et al. 2010) et à une réduction significative du diamètre des adipocytes des SF et VF (Article 2, Fig.5), (Manolescu et al. 2014). La réduction de dimension des adipocytes dans les SF et VF, contribue, du moins en partie, à la diminution du poids corporel observée et à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Manolescu et al. 2010). Il avait été démontré que l'augmentation de la taille adipocytaire contribue à la résistance à l'insuline (Lundgren et al. 2007). D'autres équipes ont démontré que la perte de poids chez d'autres animaux, traités avec des doses d'AR plus grandes que la nôtre, était due à la diminution de l'adipogenèse, à l'augmentation de lipolyse et à l'augmentation du métabolisme énergétique et non pas à la perte d'appétit ou à un effet toxique (Bonet et al. 2012). Ceci est en accord avec nos profils d'expression (mRNA) dans le SF et le VF engendrés par notre traitement à l'AR (Article 2, Fig.1), pour certains gènes spécifiques au métabolisme de la vitamine A (ex. : CRBP, RALDH, CRABP, RAR, RXR), gènes pouvant également co-participer à l'inhibition de l'adipogenèse, de la différenciation adipocytaire et de l'accumulation de lipides (Frey and Vogel 2011). Les effets anti-obésité de l'AR sont modulés par ses récepteurs nucléaires spécifiques (RAR ; RXR) et ses hétéro-dimères (ex. : RAR-RXR, RXR-PPAR, RXR-TR), avec d'autres molécules participant au métabolisme énergétique (Berry and Noy 2009, Frey and Vogel 2011). Plusieurs études sur d'autres rongeurs ont démontré que des doses plus grandes d'AR ont la capacité d'augmenter la dépense énergétique non-cinétique (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). Dans nos expériences, les souris ob/ob sont et restent léthargiques, sans différences notables - dans leurs réactions et réflexes moteurs - entre les souris ob/ob traitées et celles non-traitées à l'acide rétinoïque. D'autre part les réductions du poids corporel et des dimensions adipocytaires, que nous avons observées chez les souris ob/ob sous traitement à l'AR, sont survenues malgré un apport alimentaire similaire aux souris ob/ob non-traitées (Manolescu et al. 2010). Ceci suggère une augmentation du métabolisme énergétique non-cinétique, autrement dit statique, sous traitement à l'AR, hypothèse corroborée par plusieurs études parallèles et ultérieures aux nôtres, mais avec des doses plus grandes d'AR, d'autres modes d'administration et d'autres modèles animaux (Bonet et al. 2013, Bonet et al.

2012, Mercader et al. 2006). Les lois immuables de production d'énergie et d'utilisation des substrats énergétiques dans la bio-thermodynamique sont indépendantes de cages métaboliques. Elles nous enseignent que le corps a trois façons de produire et d'utiliser de l'énergie pour répondre à l'effort : les phosphagènes (ex. : ATP-adénosine triphosphate, créatine phosphate) en aérobie d'effort de courte durée, la glycolyse (utilisée en voie anaérobie, soit en déficit d'oxygène) et une lipolyse augmentée dans la voie aérobie d'effort de longue durée. Les substrats énergétiques dépensés dans les muscles sont donc spécifiques à chacune avec, pour une activité physique de courte durée (ex. sauter 10 sec.), de l'ATP dans les premières 1 à 6 sec. pour démarrer, de la créatine phosphate ensuite pour soutenir l'effort initial, et du glucose pour un effort intense sur courte durée (10 sec. à 3 min.) avec 1 molécule de glucose produisant seulement 2 molécules d'ATP, de l'acide lactique et de la fatigue. C'est seulement pour un effort aérobie de longue durée (au-delà de 3 min) que le corps mobilise ses réserves d'acides gras et devient énergétiquement « rentable » avec 1 molécule de glucose donnant 36 d'ATP et 1 molécule de gras donnant 130 d'ATP. Pour mieux comprendre ces aspects nous avons suivi deux autres formations, soit en kinésiologie et en actions-réactions motrices en gravité terrestre compensée (voir en annexes nos certifications par Énergie Cardio/ATARAXIA et par l'Agence Spatiale Canadienne). Même pour des personnes en bonne forme physique, il est difficile de déployer des efforts de grande intensité et de longue durée dans un petit espace et sans outils spécifiques (ex. : poids, vélo-stationnaire). Dans ces conditions, aucun mammifère obèse et diabétique ne peut déployer une activité physique d'intensité et durée suffisantes pour dépenser ses graisses. Impossible donc pour nos souris ob/ob qui équivalent à des humains hyper-obèses, malades et diabétiques. Leurs muscles sont atrophiés. Leurs réflexes moteurs - qu'ils ne peuvent pas bloquer par la volonté- manquent, même sous stimuli menaçant leur vie! Elles ne sont pas capables d'effort physique intense et long ! Donc, à ce stade, on n'a pas besoin de mesures de chaleur en cage métabolique, ni de vidéos 24h/24 pour documenter (à grands frais) la durée et l'intensité d'une activité physique qui... ne peut pas se produire! Une augmentation de leur métabolisme non-cinétique, donc statique, est plus probable. Dans nos études nous avons obtenu, validé et publié, des réductions significatives de poids corporel et dimensions adipocytaires, en utilisant une très petite dose d'AR (2µg/g poids corporel/jour) sur une courte période de seulement 16 jours (Manolescu et al. 2010, Manolescu et al. 2014).

8.3.5. L'AR influence deux gènes importants dans la genèse mitochondriale et le métabolisme du gras brun et beige : UCP1 et PGC-1 α

L'AR est connu pour influencer directement l'expression de la protéine de découplage mitochondriale 1 (UCP1) via les éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) se trouvant sur le promoteur du gène UCP1 (Alvarez et al. 1995, Brun et al. 2013, Larose et al. 1996, Mercader et al. 2010). Nous avons donc évalué l'expression du PGC-1 α et du UCP1, deux gènes essentiels dans la genèse mitochondriale et dans le métabolisme du gras brun/beige (Figure 19) (Austin and St-Pierre 2012, Bonet et al. 2013). Nous avons observé que l'expression (mRNA) des deux gènes, PGC-1 α et UCP1, était significativement augmentée sous traitement à l'AR dans le SF et le VF (Article 2, Fig.4). Cela est en accord avec d'autres études, sur d'autres rongeurs, ayant observé que des doses plus grandes d'AR stimulent l'expression des PGC-1 α et UCP1 dans le gras blanc (Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006).



Principal agents and pathways leading to browning in WAT. The UCP1 and PGC-1 α are essential for all. (Bonet et al. 2013)

Figure 19. PGC-1 α et UCP1 sont essentiels pour l'acquisition des gras brun et beige.

(adapté de Bonet et al 2013 avec permission; disponible en libre accès, citation en original et adaptations Manolescu DC 2017 sans préjudices aux droits d'auteurs, selon la FESP Université de Montréal; liste d'acronymes d'intérêt en début de la thèse)

Le PGC-1 α et l'UCP1 sont deux protéines connues pour leur implication dans la genèse mitochondriale, l'oxydation d'acides gras, la thermogenèse et la dépense énergétique dans les tissus du gras brun ou beige (Figure 19) (Bonet et al. 2013, Chen H. Y. et al. 2013). Il a été démontré que l'activation des RAR et RXR par l'AR augmentait l'expression (mRNA) des PGC-1 α et UCP1 (Brun et al. 2013, Villarroja et al. 2004). Dans nos études, l'AR a diminué l'expression de la RALDH1 dans le SF (Article 2, Fig.1). La diminution de l'expression de la RALDH1 a déjà été associée à l'induction du gras brun ou beige (Frey and Vogel 2011, Kiefer et al. 2012). La diminution des RALDH1 augmente le RAL cellulaire pouvant également stimuler l'expression (mRNA) de l'UCP1 dans le tissu gras blanc via l'activation des RAR (Frey and Vogel 2011, Kiefer et al. 2012). L'AR contrôle la maturation des adipocytes, et son transporteur cellulaire CRABP2 est réprimé durant la différenciation adipocytaire (Berry et al. 2010). La capacité de l'AR à ralentir la différenciation des pré-adipocytes de souris a été démontrée (Dimaculangan et al. 1994), mais seulement à des stades précoces et via la stimulation d'expression des RAR (Xue et al. 1996). L'expression des UCP1 est une signature moléculaire spécifique pour le gras brun (BAT) (Chen H. Y. et al. 2013). Cependant, le gras beige (parfois appelé «*brite*») présent chez l'humain et la souris, peut exprimer le PGC-1 α et l'UCP1, sous diverses stimulations, dont celle par l'AR (Figure 19) (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Lidell et al. 2013, Lidell et al. 2014, Mercader et al. 2006, Wu J. et al. 2012).

8.3.6. L'AR influence la morphologie du tissu adipeux, suggérant des caractéristiques de gras beige et/ou brun

Chez nos souris ob/ob traitées à l'AR, l'étude histologique a démontré dans le SF et le VF (Article 2, Fig.5, Fig.6), un nombre augmenté d'adipocytes de petite taille et forme polygonale (Figure 20), morphologie reconnue du gras brun ou beige (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006, van Marken Lichtenbelt et al. 2009, Wijers et al. 2009). Ayant besoin de plus d'oxygène, le gras brun est plus vascularisé que le gras blanc, avec plus de capillaires sanguins et de vaisseaux lymphatiques normaux (Kuroshima 1993). Nos coupes histologiques, ont également montré des signes précurseurs de développements capillaires (angiogenèse) dans les gras des souris traitées à l'AR (Article 2, Fig.5, Fig.6). Peut-être qu'une période plus longue de traitement et/ou une dose plus grande d'AR aurait pu renforcer ce phénotype vasculaire. D'autres investigations, notamment des analyses d'immunofluorescence, seraient nécessaires

pour le valider. Néanmoins, nos observations de morphologies adipocytaires après colorations à l'hématoxyline-éosine, sont compatibles avec d'autres études (Figure 20) ayant démontré la capacité de l'AR à promouvoir du gras beige (Bonet et al. 2012) ou à remodeler du gras blanc vers l'acquisition d'une morphologie de gras brun (Bonet et al. 2013, Mercader et al. 2006). De petites doses d'AR *all-trans* peuvent stimuler la maturation des pré-adipocytes chez les souris (Safonova et al. 1994a, Safonova et al. 1994b). D'autres molécules (ex. : PPAR ligands, des acides gras dérivés de lipolyse, BNP) ont également été démontrées capables de promouvoir du gras beige-brun dans le tissu adipeux blanc, mais la plupart d'entre elles dépendent des dimères de leurs récepteurs nucléaires avec le RXR ; donc ils ont besoin d'AR pour activer la composante RXR des dimères (Brun et al. 2013, Villarroya et al. 1999, Villarroya et al. 2004). L'ANP et le BNP ont été décrits comme des hormones cardiaques, capables d'induire du gras brun-beige (Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012). Dans nos études, le traitement à l'AR à petite dose a augmenté l'expression (mRNA) de l'ANP et du BNP dans les cardiomyocytes (Manolescu et al. 2014). On avait observé chez les souris qui surexpriment le BNP une diminution du gras corporel et une lipolyse augmentée (Miyashita et al. 2009). L'exposition au froid stimule les gras brun et blanc via la norépinephrine qui se lie aux récepteurs bêta-adrénrgiques et provoque l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et glycérol (Kuroshima 1993). Dans les adipocytes bruns, les acides gras sont oxydés directement et rapidement sous l'influence de la protéine UCP1, produisant de la chaleur, mais pas de l'ATP. Ceci fait partie d'un processus nommé thermogénèse sans frissonnements « *non-shivering thermogenesis* » (Kuroshima 1993). La signalisation bêta-adrénrgique est aussi activée par la thermogénèse alimentaire (post-repas) (Bachman et al. 2002). Les mammifères arctiques possèdent la plus grande quantité de gras brun et utilisent la thermogénèse pour s'adapter au froid. Ce sont également les animaux qui accumulent le plus de vitamine A dans leur foie (Senoo et al. 2012). L'AR dérivé de la vitamine A est reconnu pour son implication dans la différenciation et la maturation cellulaires et pourrait guider la transformation de pré-adipocytes en adipocytes beige-bruns au lieu de blancs (Mercader et al. 2006). Stimulé par le froid, le gras beige-brun contribue davantage à augmenter le métabolisme au repos (Bonet et al. 2013, Mercader et al. 2006). Dans notre étude nous n'avons pas exposé nos souris au froid pour stimuler davantage leur gras brun, mais le gras brun possède déjà un métabolisme oxydatif au repos plus grand que celui du gras blanc. Il participe aussi à la thermogénèse alimentaire.

D'autres équipes ont démontré que des doses plus grandes d'AR peuvent induire la formation de gras brun-beige chez d'autres rongeurs (Figure 20B) et également augmenter le métabolisme oxydatif dans les adipocytes matures (Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2007, Mercader et al. 2006). Dans notre étude, nous avons utilisé une dose d'AR parmi les plus petites ($2\mu\text{g/g}$ corps) pour une période de temps parmi les plus courtes, seulement seize jours (Bonet et al. 2012). Elle fut intégralement assimilée car l'AR est très vite absorbé au contact des muqueuses; l'appétit était bon et aucun signe clinique (ex.: vomissements, dyspepsie, diarrhée, ballonnements, gaz) n'indique un quelconque risque de nourriture non-absorbée. Lors d'études de pharmacocinétique chez l'humain, il est important de commencer avec une petite dose d'AR, afin d'éviter les effets indésirables de grandes doses d'AR sur de longues périodes.

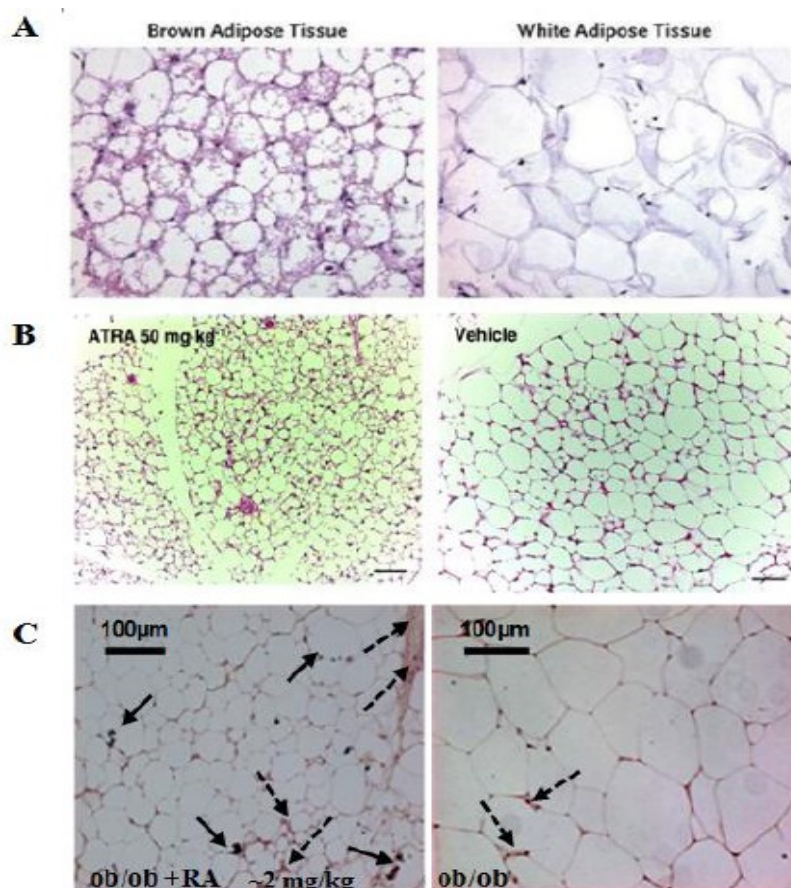


Figure 20. Comparaisons des gras +RA et véhicules vs des gras blanc et brun natifs.

A) Gras bruns et blancs, B) Gras+RA/50mg/Kg et C) Gras+RA/2mg/Kg vs véhicules
A-van Marken Lichtenberg 2009, B-Mercader 2006, C-Manolescu et al 2010, 2014, 2017
Citations en original sans préjudices aux droits d'auteurs; FEP Université de Montréal

8.3.7. L'AR stimule l'accumulation d'acides gras non-saturés dans les tissus adipeux

Dans le processus d'extraction de rétinoïdes pour leur analyse subséquente par HPLC, nous avons traité des tissus adipeux (SF et VF) avec des solvants organiques (ex : butanol/acétonitrile), libérant ainsi en solution les divers acides gras (FA, « *fatty acids* ») contenus. Après douze heures dans le congélateur à -20°C, nous avons observé une légère séparation dans nos échantillons provenant des souris ob/ob traitées à l'AR, en deux phases d'agrégation: l'une liquide en surface et l'autre solide au fond. Les échantillons lipidiques provenant des souris ob/ob non traitées à l'AR étaient, eux, solides à -20°C. Les échantillons provenant des souris témoins en santé étaient majoritairement solidifiés, certains avec une très mince couche plus fluide en surface. A la température ambiante de la pièce (24°C) les trois types d'échantillons (souris en santé, ob/ob et ob/ob AR +), étaient liquides.

L'apparition d'un surnageant liquide huileux - seulement en surface des échantillons des souris ob/ob traitées à l'AR - indique une présence plus importante d'acides gras non saturés (UFA, « *unsaturated fatty acids* »), les seuls qui restent en phase d'agrégation liquide même lorsque la température ambiante baisse en deçà de 0°C. Les acides gras saturés (SFA, « *saturated fatty acids* »), quant à eux, changent de phase d'agrégation en devenant solides avec la baisse de la température vers 0°C, selon la loi universelle de la chimie-physique appelée point de fusion spécifique. Un mélange de deux types d'acides gras (SFA et UFA), liquide à la température ambiante, se séparera en deux phases par exposition à -20°C, l'une solide en bas et l'autre liquide en haut respectivement. C'est une cryoséparation, (voir diagramme plus bas). Une phase liquide à -20°C, nous permet déjà d'affirmer que notre traitement à l'AR stimule l'accumulation d'acides gras polyinsaturés (PUFA) dans les tissus adipeux. Car seulement les PUFA ont un point de fusion si bas. Par exemple l'acide α -oléique de type O3/C18:1-*cis*, puisque son point de fusion (-32°C) est plus bas que -20°C. Pour doublement confirmer par mesure directe les types des PUFA, il faudra les analyser par HPLC. La littérature nous indique que les UFA/PUFA et les acides gras a longue chaîne sont plus présents dans les BAT que dans le WAT (Townsend KL et al 2014, Roberts JL et al 1986, Laukola S. et al 1980). Il s'en suit que notre présente observation de cryoséparation est un argument de plus qui, avec nos indices histologiques (ex.: morphologie et taille adipocytaires, angiogenèse) et génomiques (surexpression des PGC1 α et UCP1), suggère et appuie le fait que l'AR stimulerait la formation de BAT.

On pourrait même spéculer sur les mécanismes par lesquels l'AR arrive à stimuler l'accumulation des UFA (PUFA) dans les tissus adipeux. À la différence des WAT qui ont une oxydation interne des FA quasi inexistante, dans le BAT nous trouvons plusieurs processus qui influencent les valeurs des ratios UFA/SFA, soit : la captation via des enzymes LPL membranaires des adipocytes qui hydrolysent les triglycérides (TG) de la circulation en acides gras libres (FFA) et mono-acyl-glycérol (MA), la lipogenèse *de-novo* (conclue par une phase de désaturation des FA), la lipolyse, l'oxydation et même une autophagie augmentée (Calderon-Dominguez M et al. 2015, 2016, Martinez-Lopez et al. 2016, Lladò I et al. 1997, Groscolas R.1997). On pourrait donc spéculer sur l'influence de l'AR sur l'un, deux ou même tous ces processus, dans le sens d'une accumulation des PUFA dans les tissus adipeux. Ainsi, un scénario d'optimisation pour augmenter cette quantité des UFA, serait que l'AR augmente l'expression et l'efficacité des LPL adipocytaires pour une absorption sélective des UFA circulants, qu'il stimule l'expression et/ou l'activité de plusieurs désaturases ou encore qu'il va stimuler la lipolyse et même une autophagie et une oxydation prioritaires des SFA. La résultante sera l'augmentation du rapport UFA(PUFA)/SFA dans les tissus adipeux. Voilà des axes de recherche valables pour la recherche biomoléculaire spécialisée (réductive), obtenus par observation et par une recherche d'optimisation comparative intégrée (systémique).

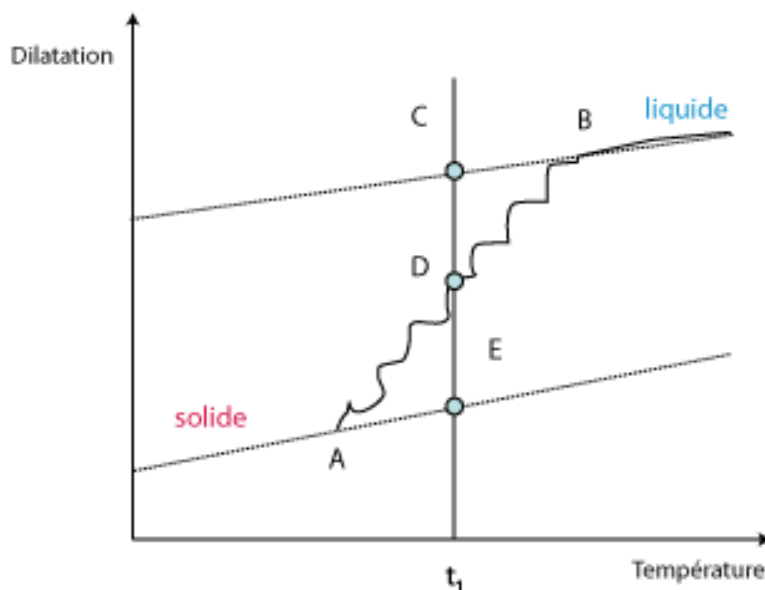


Diagramme de la dilatation et points de fusion des acides gras selon la température
(Réf. [http://biochim-agro.univ-lille1.fr/lipides/co/Cours B 2.html](http://biochim-agro.univ-lille1.fr/lipides/co/Cours_B_2.html)) – citation en libre acces

8.3.8. L'AR pourrait influencer l'activité d'autophagie dans les tissus adipeux

Dans nos études histologiques, nous avons identifié parfois des amas de granules ressemblant aux granules autophagiques. C'est une hypothèse en marge de nos études. Nous avons trouvé moins de ces granules dans les adipocytes hypertrophiés du SF et du VF de souris ob/ob, comparativement aux souris témoins minces et en santé (Article 2, Fig.6B). Le traitement à l'AR semble avoir augmenté les agglomérations de ces granules possiblement autophagiques dans le SF et le VF des souris ob/ob (Article 2, Fig. 5, Fig.6B) en association avec la réduction de l'hypertrophie adipocytaire (Article 2, Fig. 5A et B), du poids corporel et de la résistance à l'insuline (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010). Il est possible que le traitement à l'AR puisse avoir une influence bénéfique pour rééquilibrer l'activité autophagique de tissus gras des souris ob/ob, vers son profil observé dans les souris témoins minces et en santé. L'autophagie est un processus catabolique lysosomal intracellulaire, préservé à l'échelle évolutive pour recycler les organelles cellulaires endommagés (on l'appelle alors autophagie constitutive) ou pour mobiliser des nutriments intracellulaires pour satisfaire des besoins en énergie (on l'appelle alors autophagie adaptative) lors de périodes de jeûne ou de pénurie alimentaire (Kim K. H. and Lee 2014). L'autophagie est aussi impliquée dans l'homéostasie énergétique de l'organisme au niveau cellulaire. Dans les tissus adipeux, les triglycérides des vacuoles lipidiques, peuvent être brisés par hydrolyse par les lipases cytosoliques, mais aussi par des lipases lysosomales via un processus autophagique nommé « lipophagie » (Singh et al. 2009, Skop et al. 2012). Trois formes d'autophagie, qui se complètent les unes les autres, ont été décrites à ce jour : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des chaperons (Kim K. H. and Lee 2014). L'AR peut promouvoir la maturation des autophagosomes et influencer la macro-autophagie par des mécanismes indépendants de ses récepteurs nucléaires RAR et RXR (Rajawat et al. 2010). L'AR peut aussi stimuler l'autophagie médiée par des chaperons (CMA) par activation de ses récepteurs nucléaires RAR (Anguiano et al. 2013). L'obésité a été associée à diverses dérégulations autophagiques dans un état inflammatoire chronique, la résistance à l'insuline et le diabète (Kim K. H. and Lee 2014, Koga et al. 2010, Stienstra et al. 2014). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore complètement compris. Chez l'humain, l'obésité et le diabète ont été associés à une autophagie augmentée (Jansen et al. 2012, Kovsky et al. 2011). Chez des rongeurs obèses et insulino-résistants avec diète riche en gras, l'autophagie est réduite

et est associée à de l'inflammation et à de l'hypertrophie adipocytaire (Yoshizaki et al. 2012). L'autophagie est plus présente dans le gras brun que dans le gras blanc et elle est davantage stimulée par l'exposition au froid (Figure 21) (Martinez-Lopez et al. 2016).

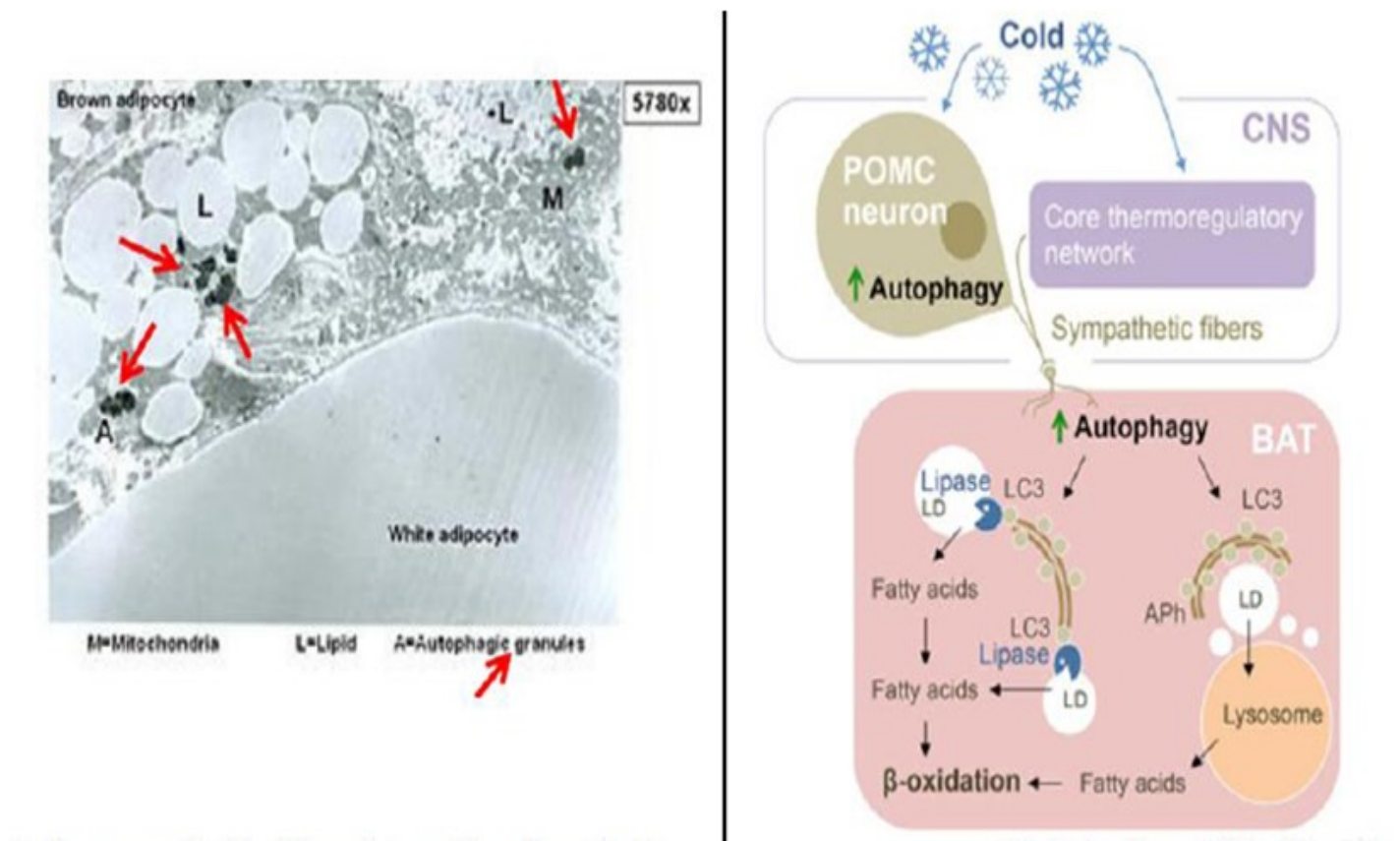


Figure 21. L'autophagie est présente plus dans le BAT et elle est stimulée par le froid

adapté de Martinez-Lopez et al. 2016; disponible en libre accès, citation en original sans préjudices aux droits d'auteurs; conforme politique FESP-Université de Montréal; CNS-système nerveux central, BAT- tissu adipeux brun, LD-goutellette lipidique, LC3-autophagosome, POMC-proopiomelanocortine; liste complète des acronymes d'intérêt disponible en début de la thèse.)

8.4. La réduction de la résistance à l'insuline par l'AR ; résultante de carrefour entre le métabolisme de la vitamine A et le métabolisme énergétique

Le traitement à l'AR réduit de 7,4% le poids corporel des souris ob/ob traitées comparativement à celles non traitées, malgré des apports alimentaires, réactions et réflexes moteurs semblables dans les deux groupes (Article 1, Fig.1) (Manolescu et al. 2010). Ceci suggère une amélioration des éléments du métabolisme énergétique non-cinétique de repos (possiblement la thermogenèse alimentaire ou l'autophagie associée au gras brun). Le traitement à l'AR est associé à un profil d'expression de récepteurs nucléaires (ex.: RAR↑, RXR↓) (Article 2, Fig.1) reconnu pour être associé à une adipogenèse réduite (Berry et al. 2012b, Ziouzenkova O et al. 2007a). Il est également associé à une augmentation de l'expression (mRNA) de gènes PGC1α↑, UCP1↑ (Article 2, Fig.4) traditionnellement associés à une augmentation de la genèse mitochondriale, de la capacité thermogénique, de la thermogenèse par transport de protons et de la lipolyse (Mercader et al. 2010), ainsi qu'à des adipocytes de petite taille dans les gras sous-cutané et viscéral (Article 2, Fig.5) et (Article.3, Fig.2) (Manolescu et al. 2014). Impliqués dans la genèse mitochondriale, le PGC1α et d'autres gènes qui en dépendent sont réprimés dans le diabète (Mootha et al. 2003, Patti et al. 2003). Les gènes des UCP (« *uncoupling protéines* ») qui sont naturellement exprimés dans le tissu adipeux brun (BAT), présent surtout dans le gras sous-cutané, sont impliqués dans la thermogenèse adaptative et alimentaire. Notre traitement à l'AR induit l'expression des gènes UCP1 dans le gras sous-cutané et viscéral de souris, tel que confirmé par d'autres études aussi (Mercader et al. 2010, Mercader et al. 2006). Il est donc possible que du gras de type brun ait été produit dans ces tissus adipeux, par le traitement avec de l'acide rétinoïque. Il existe deux types de tissus gras qui expriment les UCP : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux beige (développé à partir du tissu adipeux blanc). Il existe une controverse quant à l'origine du tissu adipeux beige, à savoir s'il provient de pré-adipocytes blancs ou d' adipocytes blancs matures (Rosen and MacDougald 2006), mais au-delà de ça, l'induction de gras beige dans le tissu adipeux blanc représente une voie attrayante pour diminuer l'obésité et prévenir les maladies associées (Bonet et al. 2013). Le traitement à l'AR, est associé à une réduction du ROL dans le gras sous-cutané, viscéral et dans les muscles, et à une augmentation des RE dans le foie (Article 2, Fig.2). Il est également associé à une augmentation de l'expression (mRNA) d'au moins un cytochrome CYP (A ou B), qui dégradent l'AR dans les mêmes tissus (Article 2, Fig.1). Ces modifications suggèrent que

les besoins des tissus périphériques en AR sont (du moins en partie) directement comblés par l'AR exogène. Le traitement à l'AR diminue la demande de tissus périphérique pour les réserves hépatiques de vitamine A (RE). Il s'ensuit une baisse de la mobilisation subséquente des RE, ainsi que de la sécrétion hépatique de ROL-RBP4 dans le sang. En conséquence, les réserves hépatiques de vitamine A (RE) sont normalisées (Article 2, Fig. 2D). L'expression réduite (mRNA) de l'adipokine RBP4 autant dans le SF que dans le VF, (Article 2, Fig. 1), suggère une diminution de la synthèse et de sécrétion de cette adipokine dans le sang. Il est donc suggéré qu'une baisse de la concentration sérique de la RBP4 (d'origine hépatique et adipeuse), la réduction du poids corporel et de l'adipogenèse, ensemble avec une augmentation d'expression de gènes impliqués dans la genèse mitochondriale, la thermogenèse et la lipolyse, contribuent globalement à la diminution de la résistance à l'insuline et à l'amélioration de la tolérance au glucose chez la souris diabétique ob/ob. Ainsi, toutes nos observations depuis 2008 sont compatibles avec un rôle potentiel des rétinoïdes dans l'obésité et le diabète, étant donné leur implication dans l'adipogenèse, la lipolyse, la différenciation adipocytaire et le métabolisme énergétique (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). A partir de la littérature, nous avons schématisé le métabolisme cellulaire des rétinoïdes et leurs impacts sur le tissu adipeux (Article 2, Fig.6).

8.5. Le potentiel cardio-protecteur de l'AR chez la souris diabétique *ob/ob*

La souris ob/ob est un modèle animal déficient en leptine (Lep -/-), qui se caractérise par de l'obésité, une résistance à l'insuline, une hyperinsulinémie et une hyperglycémie sévères (Mazumder et al. 2004). Ces souris développent avec le temps des dysfonctions cardiaques (Schmieder and Messerli 1987, Van den Bergh et al. 2008), associées à une réduction de la synthèse du BNP (Bartels et al. 2010), de l'accumulation de collagène dans le cœur, et à une apoptose des cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). L'accumulation de collagène, menant à la fibrose, est reconnue pour augmenter les risques de dysfonctions cardiaques. Nos travaux, ont démontré que notre traitement spécifique à l'AR chez les souris ob/ob, prévient la fibrose et l'accumulation de collagène dans le cœur, ainsi que l'apoptose de cardiomyocytes. De plus, ces effets de l'AR sont associés à une diminution du poids corporel et une amélioration significative du métabolisme du glucose (Manolescu et al. 2010). Chez la souris ob/ob âgée de douze semaines, le poids corporel était presque doublé comparativement aux souris minces et en santé.

Le traitement avec AR a diminué le gain pondéral (7.4% en moins; $p < 0.05$; le jour 16) comparativement aux souris ob/ob non-traitées. Cet effet est dû, au moins en partie, à la réduction de la taille des adipocytes (SF, VF) et donc de matière grasse (Article 2, Fig.5) (Manolescu et al. 2014). Cela fut associé à une diminution de la glycémie de base, indiquant une amélioration dans le métabolisme du glucose (Manolescu et al. 2014, Manolescu et al. 2010). Cela confirme nos observations antérieures à l'effet que le traitement à l'AR améliore la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose chez les souris ob/ob (Manolescu et al. 2010). La réduction du poids corporel et de la taille des adipocytes ont été observées sans changements significatifs dans la consommation alimentaire ou les réflexes locomoteurs, comparativement aux souris non-traitées, ce qui suggère une influence de l'AR dans l'amélioration du métabolisme énergétique. Récemment, il a été démontré que les hormones cardiaques ANP et BNP peuvent aussi influencer le métabolisme de gras brun (Whittle and Vidal-Puig 2012). Elles ont également été trouvées actives sur plusieurs axes (ex.: cGMP/PKG/p38MAPK, PGC-1, UCP1) pouvant induire la formation de gras beige/brun à partir du gras blanc humain et murin (Bonet et al. 2013, Bordicchia et al. 2012). Ceci suggère que le cœur peut jouer un rôle important dans la biologie du tissu adipeux. Cette observation est en accord avec le fait que des souris transgéniques surexprimant le BNP, restent maigres malgré une diète riche en gras (HFD « *high fat diet* »), probablement à cause d'une masse adipeuse réduite par une lipolyse augmentée sous l'influence du BNP (Miyashita et al. 2009). De plus, il a été observé chez des rongeurs obèses, que l'AR augmente la lipolyse, diminue la masse grasse et augmente la sensibilité à l'insuline (Bonet et al. 2012). Une diminution du gras est aussi associée à une diminution de la résistance à l'insuline (Lundgren et al. 2007). L'équipe de Berry et al a observé que l'AR supprime l'adipogenèse et diminue l'obésité (Berry et al. 2012b). D'autres auteurs ont démontré que l'adipogenèse est influencée par la production endogène d'AR catalysée par les enzymes RALDH1 (Reichert et al. 2011). Ils ont également démontré qu'un traitement avec de l'AR chez des souris C57/BL6 inhibe par rétroaction les enzymes RALDH1, tout en diminuant la formation de la masse grasse (Reichert et al. 2011). Nos études sur le cœur ont également démontré une diminution de la RALDH1 chez les souris ob/ob traitées à l'AR (Manolescu et al. 2014). Toutefois la signification et la caractérisation d'un potentiel mécanisme de rétroaction dans le cœur restent encore à être démontrées. Le niveau de peptides natriurétiques (ANP ; BNP) dans le plasma et le tissu cardiaque est réduit en conditions d'obésité, de résistance à l'insuline

et de diabète, autant chez la souris que chez l'humain (Moro et al. 2004, Moro 2013). La BNP est généralement connue comme une hormone cardioprotectrice, qui prévient l'hypertrophie, la fibrose et l'apoptose des cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). Dans nos études, nous avons observé que l'expression diminuée de la BNP dans les cœurs des souris ob/ob était normalisée par notre traitement spécifique à l'AR (Manolescu et al. 2014). Cet effet bénéfique est aussi appuyé par une étude ultérieure de nos collaborateurs de l'équipe Gutkowska Y, qui démontre que l'augmentation des concentrations sanguines de BNP est associée à une réduction significative de l'obésité, de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline chez la souris db/db (Plante et al. 2014b). Leur traitement avec BNP a diminué l'accumulation de gras et les dimensions des adipocytes, de concert avec une diminution de poids et une augmentation de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose (Plante et al. 2014b). Il a aussi été observé que le traitement avec BNP induit la formation d'adipocytes de type brun, qui expriment l'UCP1, une protéine impliquée dans la dissipation de l'énergie cellulaire sous forme de chaleur (Plante et al. 2014b). L'effet cardio-protecteur de la BNP se manifeste également par l'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes, l'inhibition de la fibrose cardiaque et de l'hypertrophie du cœur, ainsi que par la normalisation des enzymes AMPK et eNOS dans le cœur (Plante et al. 2014b). L'activité anti-fibrotique de la BNP est aussi appuyée par le fait que la fibrose cardiaque est un phénotype dominant chez les souris transgéniques avec BNP invalidé (KO) (Tamura et al. 2000). L'effet bénéfique d'un traitement à l'AR contre la fibrose cardiaque, a aussi été rapporté chez des rats hypertendus (Lü et al. 2003), dans l'infarctus expérimental du myocarde (Paiva et al. 2005), et chez des rats avec insuffisance de la valve aortique (Choudhary et al. 2008b). De plus, la prolifération des fibroblastes cardiaques induite par l'angiotensine-II et la synthèse de collagène, est inhibée par un traitement à l'AR (He et al. 2006), indiquant qu'une signalisation modulée par l'AR est impliquée dans la régulation de la fibrose cardiaque. Dans le cœur adulte, il a été démontré que le facteur de transcription GATA4 produit des effets anti-fibrotiques et anti-apoptotiques (Huang et al. 2008) par la stimulation de la production des ANP, BNP et Bcl-2. La réduction de la protéine GATA4 dans le cœur des souris ob/ob (Manolescu et al. 2014) a également été observée dans d'autres modèles de diabète, incluant les souris db/db et des rats traités avec de la streptozotocin (Kobayashi S. et al. 2007). La diminution de GATA4 est suggérée comme étant une conséquence d'hyperglycémies (Kobayashi S. et al. 2007). Dans nos études, le traitement avec de l'AR chez des souris ob/ob a diminué l'hyperglycémie,

normalisé la concentration de protéine GATA4 dans le cœur et augmenté la synthèse des peptides dépendants, y compris la BNP et la Bcl-2 (Manolescu et al. 2014). L'AR a favorablement influencé des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose dans les cardiomyocytes. Ainsi la protéine anti-apoptotique Bcl-xl était diminuée (WB) chez la souris ob/ob, une situation qui fut corrigée par le traitement à l'AR (Article 3, Fig.5A). Une sous-expression (mRNA) du gène de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a également été observée chez les souris ob/ob (Article 3, Fig.5B) comparativement aux témoins, alors que l'expression (mRNA) du gène de la protéine pro-apoptotique Bax restait inchangée (Article 3, Fig.5C). Le traitement à l'AR était associé à une diminution du ratio des expressions **Bax** (pro-apoptotique) / **Bcl-2**(anti-apoptotique) (Article 3, Fig.5D), ratio qui était élevé chez les souris ob/ob par rapport aux souris témoins minces. De plus la *Pro-Caspase-3* et *Cleaved-Caspase-3*, deux autres protéines pro-apoptotiques, qu'on retrouvait à teneurs élevées (WB) chez les souris ob/ob par rapport aux témoins, ont été diminuées par l'AR (Article 3, Fig. 5E, 5F). La diminution du collagène et de l'apoptose dans les cœurs des souris ob/ob traitées à l'AR est donc compatible avec une synthèse augmentée de GATA4 et d'autres gènes cardio-protecteurs dépendants (Manolescu et al. 2014). Ce rôle protecteur anti-apoptotique du GATA4 est appuyé par le fait que GATA4 prévient le remodelage pathologique du cœur suite à l'infarctus de myocarde chez des rats (Rysä et al. 2010). Il a également été démontré que l'AR peut directement augmenter la synthèse de GATA4 (Arceci et al. 1993), qui est impliqué dans la synthèse ultérieure de protéines dépendantes du GATA-4 ayant un rôle préventif anti-fibrotique et anti-apoptotique dans le cœur. Le traitement à l'AR était également associé à la normalisation de l'expression (mRNA) de l'OT et de l'OTR, qui étaient diminuées dans les cœurs des souris diabétiques ob/ob (Manolescu et al. 2014). Ceci est en accord avec un traitement à l'AR, qui a provoqué une augmentation significative de l'ocytocine (OT) autant au niveau de l'expression génique qu'au niveau protéique dans le cœur de rats (Jankowski et al. 2004). Des analyses cellulaires, ont démontré que le GATA4 co-participe à la différenciation des cardiomyocytes stimulée par l'OT via une cascade de signalisation dépendante de l'AR (Jankowski et al. 2004). Cela est complémentaire avec la présence des éléments de réponse au GATA4, sur le promoteur du gène OTR (Uchida et al. 2007). Certaines études ont démontré que l'OT diminue l'obésité (Deblon et al. 2011, Zhang G. and Cai 2011), et que des rats obèses traités avec l'OT ont développé des adipocytes de petite taille, comparativement aux animaux témoins (Eckertova et al. 2011). Notre

traitement à l'AR entraîne une augmentation de l'expression de l'OT dans le cœur des souris ob/ob, et procure ainsi un effet cardio-protecteur. En effet l'ocytocine augmente les marqueurs antioxydants (Szeto A. et al. 2008), active les canaux mitochondriaux K+ATP (Alizadeh et al. 2010), diminue la mort cellulaire via la voie de signalisation PI3K/Akt (Kobayashi H. et al. 2009), stimule la production d'oxyde nitrique (NO) (Danalache et al. 2007), stimule la protection anti-inflammatoire (Jankowski et al. 2010a) et stimule la production des peptides natriurétiques ANP et BNP (Gutkowska et al. 1997). Il a été démontré que l'ocytocine active dans le muscle cardiaque des voies de signalisation sensibles à l'insuline (Florian et al. 2010). Alors l'ocytocine stimulée par notre traitement à l'AR, pourrait à son tour stimuler l'absorption de glucose et contribuer ainsi à l'amélioration de la tolérance au glucose de nos souris ob/ob. Un autre stimulateur de la voie de signalisation cGMP/PKG, l'oxyde nitrique (NO), produit principalement dans le cœur sous l'effet de l'enzyme eNOS, est impliqué dans le bon fonctionnement du système cardiovasculaire (Ignarro et al. 1999). Nos études démontrent que l'expression de l'eNOS est réduite chez la souris ob/ob et est corrigée par notre traitement à l'AR (Manolescu et al. 2014). Il a été démontré que l'AR augmente la production de NO dans des cellules endothéliales, par la phosphorylation de l'eNOS, via la voie de signalisation (PI3K/Akt) dépendante des RAR, jouant ainsi un rôle bénéfique pour l'endothélium vasculaire (Urano et al. 2005). Ceci est hautement bénéfique si nous tenons compte du fait que l'activité de la voie de signalisation PI3K/Akt dépendante du RAR, est diminuée chez les souris ob/ob (Trivedi et al. 2008).

9. Limites

Sur l'axe de cardio-protection, nos études démontrent que l'acide rétinoïque pourrait avoir une action cardiaque directe, puisqu'il a augmenté l'expression de l'ANP et du BNP. Néanmoins, nous n'avons pas investigué l'aspect fonctionnel des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR ; RXR) dans le cœur. Dans ce sens, la piste des hétéro-dimères RAR-RXR se trouvant sur les promoteurs des gènes OTR, ANP et BNP est à explorer (Reichert et al. 2011).

Nous avons démontré que le traitement à l'AR, chez des souris obèses et diabétiques ob/ob, diminue le ROL et la RBP4 sériques, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, la glycémie et le poids corporel sans diminuer l'appétit (Manolescu et al. 2010). Il diminue également les dimensions des adipocytes des SF et VF (Article 2), (Manolescu et al. 2013, 2014,

2015). La perte de masse grasse - en conditions d'apport alimentaire et des réflexes moteurs similaires chez les animaux traités et non-traités - suggère une amélioration du métabolisme énergétique. Cependant, nous n'avons pas quantifié et détaillé par type les dépenses énergétiques (ex.: métabolisme de base, thermogenèse, autophagie, réflexes pilomoteurs ou autre activité motrice soit-elle minimale) afin d'évaluer leurs contributions par jour à la perte de poids corporel et à la réduction de la masse grasse obtenues. Pour cela nous aurions eu besoin du budget nécessaire pour approfondir les investigations. Néanmoins, des groupes parallèles au nôtre, cités dans la revue experte en la matière de Bonet et al en 2012, indiquent que les rétinoïdes, dont l'AR injecté en doses plus grandes que la nôtre, réduisent le gras corporel chez d'autres rongeurs que les ob/ob, stimulent l'activité mitochondriale et augmentent la dépense énergétique (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Mercader et al. 2006). Nous avons trouvé augmentée l'expression (mRNA) des gènes PGC1 α et UCP1 qui jouent un rôle important pour la genèse mitochondriale (Austin and St-Pierre 2012) et le métabolisme énergétique dans le gras beige/brun (Chen H. Y. et al. 2013). Pour mieux caractériser l'existence, les dimensions et la fonctionnalité des tissus adipeux beige/bruns, les PGC1 α , UCP1 et autres gènes spécifiques, pourraient être mesurés au niveau protéique (Western Blot, immunohistochimie) également.

Dans nos coupes histologiques, nous avons trouvé des signes précurseurs des infiltrations de vaisseaux capillaires (angiogenèse) (Art.2 Fig.5 ; Fig.6) dans le gras des souris traitées avec AR. Nous avons trouvé aussi des adipocytes de petite taille et forme polygonale (Art.2 Fig.5 ; Fig.6) caractéristiques du BAT. Cependant pour mieux investiguer d'éventuels développements de vaisseaux capillaires (angiogenèse), des analyses par immunofluorescence devraient être faites. Toutefois, au niveau des colorations tissulaires avec l'hématoxyline-éosine, la littérature montre des images similaires aux nôtres (Figure 20) pour les distinctions morphologiques entre le gras blanc (WAT) et le gras beige-brun (BAT) (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006). Le remodelage est à l'étude dans le gras blanc (WAT) et le gras beige/brun (BAT) (Lee and Cowan 2014) pour voir s'ils proviennent des préadipocytes beiges/bruns spécifiques, de myoblastes (Saely et al. 2012) ou même, par trans-différenciation, des adipocytes blancs matures aussi (Rosen and MacDougald 2006). Nos études sont limitées et ne peuvent pas répondre de façon définitive à ces questions.

Nous avons remarqué (par cryoséparation à -20°C au congélateur) une présence accrue d'acides gras PUFA dans les tissus adipeux des souris ob/ob traitées à l'AR. Selon la biologie

systemique ceci est un argument de plus qui, avec nos indices histologiques (ex. : morphologie et taille adipocytaires, angiogenèse) et génomiques (surexpression des PGC1 α et UCP1), appuie le fait que l'AR stimule la formation de BAT. Pour identifier le type exact d'acides gras PUFA, il faudra les analyser par HPLC.

Dans nos études histologiques, nous avons variablement observé des amas de granules qui ressemblent aux granules autophagiques, dans le gras des souris en santé, ob/ob et ob/ob traitées à l'AR. Cela dépasse les objectifs de nos études mais pourrait être intéressant à explorer par d'autres chercheurs.

10. Conclusions

Nous avons travaillé sur des souris ob/ob femelles, hyperphagiques et caractérisées par de l'obésité avec hypertrophie adipocytaire, résistance à l'insuline et intolérance au glucose, caractéristiques similaires au diabète de type 2 chez l'humain. A notre connaissance nous avons démontré pour la première fois (de manière contextuelle et intégrée), qu'elles ont aussi un métabolisme général de la vitamine A perturbé, avec des niveaux hépatiques de vitamine A (RE) diminués et des concentrations de vitamine A (ROL; RE) augmentées dans les adipocytes (SF; VF), les muscles (SM) et dans le sang (ROL), ainsi que par des concentrations de RBP4 diminuées dans le foie et les tissus adipeux, mais augmentées dans la circulation.

Notre travail démontre également, pour la première fois dans ces contextes et chez ce type de souris sévèrement obèses et hyper-glycémiques (≥ 20 mmol/L), qu'un traitement oral avec une petite dose d'AR (2 μ g / gc / jour), pour une durée relativement courte (16 jours), diminue les concentrations circulantes de ROL et de RBP4, contribuant ainsi à diminuer la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose et l'hyperglycémie. Ce traitement normalise également les réserves hépatiques de vitamine A (RE) et les concentrations de vitamine A (ROL ; RE) dans les adipocytes (SF ; VF) et les muscles (SM) ainsi que les concentrations de RBP4 dans le foie et les tissus adipeux. Il améliore donc significativement, toujours chez les souris ob/ob, la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie du glucose et de la vitamine A. Notre traitement à l'AR diminue également leur poids corporel et l'obésité avec une diminution de la taille des adipocytes dans le gras sous-cutané et viscéral, sans altérer de façon significative les apports alimentaires des animaux traités par rapport à ceux non-traités.

Dans notre étude nous avons aussi démontré pour la première fois dans ce montage, qu'un traitement oral avec une petite dose d'AR (2µg / gc / jour), chez des souris ob/ob femelles, pour une période de temps relativement courte (16 jours), influence de manière tissu-spécifique les expressions des gènes du métabolisme des rétinoïdes. Ceci contribue probablement à la normalisation des concentrations de vitamine A, observées dans les tissus adipeux, les muscles et le foie, améliorant ainsi son homéostasie. Ce profil génique comprend une réduction, dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral, de l'expression de la RBP4 qui contribuait à la résistance à l'insuline. L'expression augmentée des PGC1α, UCP1, BNP et ANP, la morphologie des adipocytes de petite taille et de forme polygonale, ainsi que des signes de possibles infiltrations capillaires (angiogenèse) dans les tissus adipeux, suggèrent la présence de gras beige/brun dans ces tissus. La cryoséparation à -20°C nous indique une présence accrue d'acides gras PUFA dans les tissus adipeux de nos souris ob/ob traitées à l'AR. Selon la biologie systémique, ceci est un argument de plus qui, avec nos indices histologiques (ex. : morphologie et taille adipocytaires, angiogenèse) et génomiques (surexpression des PGC1α et UCP1), suggère que l'AR stimule la formation de BAT. La réduction de la taille des adipocytes et la baisse du poids corporel, en dépit d'un apport alimentaire et de réactions et réflexes moteurs similaires au souris ob/ob non-traitées, suggèrent une amélioration du métabolisme énergétique non-cinétique (statique). Notre traitement à l'AR semble également avoir augmenté, dans les tissus adipeux, des agglomérations de granules possiblement autophagiques.

Nous avons observé, pour la première fois dans un cœur diabétique, certains effets cardio-protecteurs de l'AR. Notre traitement à l'AR est associé à une normalisation de l'expression (mRNA) des gènes BNP, OT et OTR et de la concentration des protéines GATA4, OTR et eNOS dans les cardiomyocytes, alors qu'elles étaient diminuées chez les souris ob/ob. Nous avons également observé une stimulation de l'expression (ARNm) pour des gènes anti-apoptotiques et une inhibition de l'expression pour des gènes pro-apoptotiques. Ces effets sont accompagnés d'une diminution de l'apoptose et du collagène dans les cardiomyocytes. Ces observations sont en accord avec le système cardio-protecteur GATA4–ocytocine–peptides natriurétiques décrit dans la littérature, concept crucial dans la prévention du remodelage cardiaque anormal observé dans l'obésité et le diabète de type 2.

Notre travail démontre également que des améliorations importantes de profils métaboliques et cardiaques peuvent être obtenues dans l'obésité et le diabète, en dehors des

voies de signalisation strictement contrôlées par la leptine, hormone anorexigène et lipolytique reconnue mais disfonctionnelle dans l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète, et à la ménopause. Également notre travail démontre que des améliorations importantes de profils métaboliques et cardiaques dans l'obésité et le diabète, sont possibles même en dehors des voies de signalisation strictement contrôlées par des hormones sexuelles, bénéfiques pour le métabolisme énergétique mais diminuées après ménopause, chez les sujets âgés, obèses, résistants à l'insuline et diabétiques (Buyukbese MA et al. 2004, Akin F et al. 2009).

En bref, chez la souris ob/ob, notre traitement avec de l'acide rétinolique:

1) Normalise les taux de vitamine A (ROL et RE) et de RBP4 dans les tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux, les muscles squelettiques et le foie, et abaisse les taux sériques de RBP4 et de ROL associés à la résistance à l'insuline.

2) Diminue la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose et la glycémie.

3) Réduit, dans les tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux, l'expression de l'adipokine RBP4 qui contribuait à la résistance à l'insuline.

4) Module de façon tissu-spécifique l'expression des gènes du métabolisme de la vitamine A, améliorant son homéostasie et contribuant aussi (via certains de ces gènes) à une réduction de l'adipogenèse (ex. : CRBP, RALDH, CRABP, RAR, RXR).

5) Augmente l'expression de gènes reconnus pour être impliqués dans la genèse mitochondriale, la thermogenèse, la lipolyse et la plasticité adipocytaire beige/brune, directement (ex. : PGC1 α et UCP1) et/ou en association (ex. : ANP, BNP).

6) Donne des indices physiologiques et histologiques d'augmentation du métabolisme énergétique, soit: une diminution du poids corporel et de la masse grasse, en dépit d'un apport alimentaire et de réactions et réflexes moteurs similaires aux souris ob/ob non-traitées; une morphologie adipocytaire de petite taille et de forme polygonale, ainsi que des infiltrations capillaires (angiogenèse), qui suggèrent la présence de gras beige/brun.

7) Stimule une présence accrue d'acides gras UFA (PUFA) dans les tissus adipeux des souris ob/ob traitées à l'AR, prouvée par cryoséparation de phases à -20°C. Puisque les PUFA sont majoritaires dans le gras beige/brun, ceci suggère que l'AR stimule la formation de BAT;

suggestion appuyée par nos indices histologiques (ex. : morphologie et taille adipocytaires, angiogenèse) et génomiques (surexpression des PGC1 α et UCP1) précédents.

8) Prévient l'apoptose et la fibrose cardiaques, réduisant le risque cardiovasculaire.

9) Démontre, hors de tout doute, que des améliorations de profils métaboliques et cardiaques sont possibles dans l'obésité et le diabète, en dehors des voies de signalisation strictement contrôlées par la leptine, et/ou les hormones sexuelles.

Nos résultats confirment l'activité antidiabétique de l'AR, ce qui pourrait avoir une importance clinique et fournir de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives contre le diabète de type 2 chez l'humain. Les concentrations sanguines de ROL et RBP4 et leurs ratios ROL/RBP4 (ou RBP4/ROL) pourraient servir d'indicateurs complémentaires dans l'évolution physiopathologique du diabète, et d'indicateurs d'efficacité pour divers traitements. Par son effet cardioprotecteur l'AR pourrait servir dans la prévention des complications cardiovasculaires associées au diabète. Ce projet de recherche nous a également apporté de nouvelles connaissances sur la physiopathologie du diabète de type 2, en caractérisant davantage les profils de la RBP4 et du ROL dans le contexte d'obésité et de résistance à l'insuline, facteurs majeurs dans le développement du diabète. La confirmation de nos hypothèses justifie des investigations supplémentaires sur ces axes chez l'humain.

11. Contribution globale à l'avancement des connaissances

Au début de notre projet (2008), les souris ob/ob étaient très peu étudiées en ce qui a trait à l'impact de l'AR sur leur métabolisme et son potentiel à diminuer la résistance à l'insuline via une diminution de la RBP4 et du ROL circulants et tissulaires, ni pour prévenir la plasticité cardiaque anormale. Ainsi nous avons été validés parmi les pionniers (Bonnet 2012) avec nos premiers résultats (Manolescu et al 2010) ensuite complétés avec nos résultats sur le cœur (Manolescu et al. 2014). À ce jour, et à notre connaissance, nous sommes les seuls à avoir étudié certains de ces aspects contextuels et 70 études internationales nous ont cités depuis 2010. Dans l'ordre d'emphase de nos travaux, les indices anatomiques pour l'augmentation du métabolisme énergétique viennent en troisième lieu.

En premier lieu nous contribuons à l'avancement des connaissances en prouvant la capacité de l'AR à diminuer la RBP4 circulante (une première) tout en augmentant la sensibilité à l'insuline (Art.1, Manolescu et al. 2010). Plusieurs études sur des animaux et des humains ont

montré des associations fortes entre la RBP4 circulante, l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. L'équipe de Barbara Kahn (Yang et al 2005) a même démontré l'induction directe d'insulino-résistance par la RBP4 chez la souris. Toutes ces découvertes pointent vers une possible thérapie contre la résistance à l'insuline et le T2DM, par le biais d'une réduction de la RBP4 circulante. Le grand défi était d'éviter les risques d'une hypovitaminose A par perte de ROL circulant associée à une diminution artificielle de son transporteur sanguin, la RBP4. L'AR, forme active par excellence de la vitamine A, évite ce risque. De plus les variations métaboliques de la vitamine A dans l'obésité et le diabète étaient peu comprises, par exemple pour déterminer si l'augmentation de la RBP4 sanguine dans ces maladies augmente subséquemment le transport de ROL. Nous offrons (nouveau) des évaluations de ROL et RBP4 sériques et tissulaires intégrées dans un modèle animal obèse et diabétique (ob/ob) durant un traitement à l'AR. Nous montrons aussi la variation de ces indicateurs d'homéostasie de la vitamine A en association avec le diabète et les améliorations post-AR (Art.1 et 2). Nous offrons (nouveau), un profil transversal complet d'expressions de gènes du métabolisme de la vitamine A associé aux taux tissulaires de ROL, de RE et de RBP4, dans le diabète et après l'amélioration post-AR (Art.2), (Manolescu et al.2012, 2013, 2015). Depuis 2008, nous sommes les seuls à avoir étudié ces associations (Bonet et al.2012).

A titre de prévention secondaire, cette thèse examine le potentiel préventif de la vitamine A (sous forme d'acide rétinoïque) contre certains facteurs de risque pour des complications cardiométaboliques associées à l'obésité et au diabète de type 2 (Art.3, Manolescu et al.2014). Ainsi nous démontrons (nouveau) la capacité de l'AR à préserver l'axe ocytocine-peptides natriurétiques, OT-NPs-ANP-BNP-eNOS, associée à une meilleure survie cellulaire et à la prévention d'une plasticité cardiaque anormale (apoptose, fibrose) et de l'hypertrophie adipocytaire abdominale chez les souris ob/ob obèses, résistantes à l'insuline et sévèrement diabétiques (glycémie>20 mmol/L).

En complément, puisque cela n'avait pas encore été fait dans ce montage contextuel, nous avons documenté quelques impacts anatomiques d'une petite quantité d'AR (2 µg/g/pc/j) - administrée oralement pour une courte durée (9 à 16 jours) dans un modèle obèse-diabétique (ob/ob) peu investigué par rapport à l'AR, hyperphagique, sédentaire et avec un métabolisme de base réduit - sur l'appétit, le poids corporel, la morphologie et la plasticité de divers tissus adipeux (SF,VF) ainsi que sur des infiltrations capillaires (angiogenèse) en tant qu'indices

d'impact sur le métabolisme. Nous avons observé, pour la première fois à notre connaissance, que l'AR stimule une présence accrue d'acides gras polyinsaturés PUFA, dans les tissus adipeux de nos souris ob/ob traitées à l'AR, prouvée par cryoséparation de phases à -20°C. Puisque les PUFA sont majoritaires dans le gras beige/brun, c'est un argument de plus à l'effet que l'AR stimulerait la formation de BAT. Ceci est en concordance systémique avec les indices histologiques (ex : morphologie et taille adipocytaires, angiogenèse) et génomiques (surexpression des PGC1 α et UCP1) pour nos souris traitées. Dans notre étude, nous avons utilisé une dose d'AR parmi les plus petites (2 μ g/gc/j) pour une durée parmi les plus courtes (16 jours) (Bonet et al. 2012) pour un modèle animal obèse et sévèrement hyperglycémique (glycémie > 20 mmol/L). Connaissant l'activité multiple de l'AR, ceci pourrait être important lors de futures études de pharmacocinétique, afin d'éviter les effets indésirables de grandes doses d'acide rétinoïque, sur de longues durées, chez l'humain. Nous démontrons pour la première fois (en situation contextuelle) que des améliorations de profils cardiométaboliques dans l'obésité et le diabète sont possibles en dehors de voies de signalisation strictement contrôlées par la leptine, hormone anorexigène et lipolytique qui est disfonctionnelle dans ces pathologies. Améliorations également obtenues en dehors de voies de signalisation strictement contrôlées par des hormones sexuelles, diminuées chez les hommes et les femmes obèses, résistants à l'insuline et diabétiques, avec l'âge et davantage après la ménopause. Voilà une perspective prometteuse, pour des groupes à risque ! Bien qu'au-delà des objectifs de notre thèse, nous apportons aussi l'observation d'une possible diminution de l'autophagie sous l'influence du diabète, chez la souris ob/ob, et de son amélioration sous l'influence du traitement à l'AR, en administration orale, avec une dose et pour une période relativement petites. Nous avons proposé des méthodes valides pour approfondir ces observations.

Sur l'axe de la méthodologie générale dans la recherche nous proposons l'analyse par optimisation comparée, systémique et intégrative de variables (OCSIV). Il s'agit d'une intégration des concepts dynamiques de la biologie comparée des systèmes, issus d'Aristote, Colin, Botnariuc et Wiener, couplés aux algorithmes d'optimisation de la programmation linéaire de Dantzig. C'est plus efficace que l'ancienne méthode « *trial and error* » de recherche de nouvelles molécules d'intérêt pour les biotechnologies, ce qui est confirmé par les nouvelles méthodes « *target* » de criblage à haut débit profilé de molécules. Les associations «

fonctionnelles » des « *omics* » (génomique, protéomique et/ou métabolomique) avec des profils « santé » et « maladie » sont ensuite mises à profit, autant sur un plan individuel qu'intégrés. Avec l'arrivée de la bio-informatique, ces concepts ont ouvert la voie à la génomique fonctionnelle, à la pharmacogénétique, aux analyses de flux et de contrôle métabolique et au génie génétique. Nous suggérons d'appliquer les mêmes concepts de base (comparatif, systémique et intégratif) dans les recherches courantes. Guidés par les règles fondamentales de l'entropie de systèmes, dans la circulation et la conservation de l'énergie et de la matière, nous avons également proposé quelques modestes équations d'optimisation.

12. Perspectives, impacts et suggestions de recherche

Nous avons démontré les bénéfices cardiométaboliques qu'un traitement avec une petite dose d'AR, peut avoir chez des souris obèses et diabétiques ob/ob, diminuant le ROL et la RBP4 sériques, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, la glycémie et le poids corporel sans affecter l'appétit, ni les réflexes locomoteurs (Manolescu et al. 2010, 2014). Les mécanismes d'action de l'acide rétinoïque en la matière sont multiples et peuvent inclure une action cardiaque directe, puisque notre traitement à l'AR augmente l'expression (mRNA) des peptides natriurétiques ANP et BNP (Manolescu et al. 2014). Une expérimentation de validation partielle faite par nos collaborateurs a confirmé, en cages métaboliques, qu'un traitement direct avec la protéine BNP augmente le métabolisme de base et améliore-le profile cardiométabolique de souris obèses et diabétiques, db/db (Plante E et al 2014). Il serait intéressant d'investiguer l'aspect fonctionnel des récepteurs à l'AR (RAR ; RXR) dans le cœur. L'hypothèse de Reichert et al. (2011) est à prendre en considération. Selon eux, l'AR, possédant une grande affinité pour les RAR, active les hétéro-dimères RAR-RXR qui se lient à des éléments de réponse à l'AR (RARE) sur les promoteurs des gènes cibles comme l'OTR et les ANP et BNP. Pour explorer la régulation génique dans le cœur, il faut faire des études sur l'impact de l'AR en cultures de cardiomyocytes isolées de cœurs de souris adultes ob/ob. Il serait important d'examiner si l'effet de la phosphorylation induite par l'AR sur l'eNOS (Urano et al. 2005) est également présent dans les cardiomyocytes des souris ob/ob.

Les peptides natriurétiques ANP et BNP sont également impliqués dans la production de gras brun/beige (Bordicchia et al. 2012, Whittle and Vidal-Puig 2012). Plusieurs investigations seraient nécessaires sur des échantillons de gras de topologie variable et sur

plusieurs modèles de souris obèses (ex.: ob/ob, db/db, HFD) et pourraient être utiles pour établir si la stimulation et/ou l'induction des graisses beiges/brunes par l'AR, passe principalement par l'augmentation des peptides natriurétiques ANP et BNP, ou s'il existe également une action directe de l'AR sur plusieurs protéines spécifiques du gras brun (Bonet et al. 2013). Ainsi d'autres protéines, connues comme marqueurs du gras beige/brun, devraient être aussi étudiées (mRNA et WB) telles que FGF21, CIDEA, PRDM16 pour les évaluer sous l'influence de l'AR. Une littérature qui montre des évidences claires que l'AR stimule l'expression (mRNA) des PGC1 α et UCP1 ainsi que celle d'autres gènes (ex. : PPAR γ , COX-II, CPT1) impliqués dans la biologie du gras beige/brun, pourrait aussi être exploitée davantage (Bonet et al. 2013, Bonet et al. 2012, Brun et al. 2013, Mercader et al. 2006).

Nous avons trouvé que le traitement à l'AR, chez des souris obèses et diabétiques ob/ob, diminue les dimensions des adipocytes des SF et VF (Art.2), (Manolescu et al. 2014) et le poids corporel en dépit d'un apport alimentaire et de réactions et réflexes moteurs similaires chez les animaux traités et non-traités (Manolescu et al. 2010), ce qui suggère une amélioration du métabolisme énergétique. Nous avons obtenu des indices anatomiques, histologiques et physiologiques valables d'impact métabolique, comme la diminution du poids corporel et de la masse grasse, une morphologie adipocytaire de petite taille et de forme polygonale, ainsi que des infiltrations capillaires (angiogenèse), suggèrent la présence de gras beige/brun dans les tissus adipeux. Pour des mesures plus exactes, de futures équipes, en utilisant des cages métaboliques, pourraient aussi quantifier et détailler les dépenses énergétiques sous l'influence des rétinoïdes et/ou de l'exposition au froid (ex.: métabolisme de base, thermogénèse, autophagie, réflexes pilomoteurs et activité motrice, soit-elle minimale) afin d'évaluer leurs contributions dans la perte de poids corporel et la réduction de la masse grasse au jour le jour. Ces méthodes ayant des limites pour les ours et les mammifères hibernants qui sont, à notre humble avis, un bon modèle d'étude « *metabolically healthy obese* » sans diabète et de perte de poids sans activité physique. Malheureusement la « grotte métabolique d'hibernation » n'existe pas encore. Sans parler des biais énergétiques éthologiques (augmentation des hormones de stress, de cortisol, de détresse et perte d'appétit) qu'une isolation individuelle en cage métabolique inflige à des animaux grégaires, comme les souris, dépendants de phéromones et de communications de groupe pour un fonctionnement optimal. Nous pouvons apprendre à mieux intégrer complémentirement les observations et les moyens de mesures directes et

indirectes, pour de meilleurs résultats et l'optimisation des dépenses ! Les cages métaboliques restent un excellent outil de mesures directes par ailleurs !

Nous avons trouvé augmentée l'expression (mRNA) des gènes PGC1 α et UCP1 qui jouent un rôle important pour la genèse mitochondriale (Austin and St-Pierre 2012) et le métabolisme énergétique dans le gras beige/brun (Chen H. Y. et al. 2013). Nous avons observé des variations spécifiques dans l'expression (mRNA) de certains gènes (ex. : CRBP, RALDH, CRABP, RAR, RXR) impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes mais favorisant également une réduction de l'adipogenèse et l'expression des PGC1 α et UCP1 (Frey and Vogel 2011, Kiefer et al. 2012). Des études au niveau protéique (WB) pourraient pousser ces investigations plus loin, avec profit autant pour le métabolisme des rétinoïdes qu'énergétique.

Dans nos coupes histologiques, nous avons trouvé des signes précurseurs d'infiltrations de vaisseaux capillaires (angiogenèse) (Art.2 Fig.5 ; Fig.6) dans le gras des souris traitées à l'AR. Nous avons trouvé aussi des adipocytes de petite taille et de forme polygonale (Art.2 Fig.5 ; Fig.6). Ces facteurs sont associés au gras beige/brun (Bachman et al. 2002, Mercader et al. 2006, van Marken Lichtenbelt et al. 2009). Nous avons augmenté le contraste des images en faisant des copies en lumière inversée (négatifs). Mais pour mieux investiguer d'éventuels développements de vaisseaux capillaires (angiogenèse), sous l'influence de l'AR, des analyses par immunofluorescence pourraient être faites.

De futurs chercheurs pourraient investiguer la question de l'autophagie et du flux autophagique chez la souris diabétique traitée à l'AR en utilisant l'immunofluorescence et la microscopie confocale (Stienstra et al. 2014). L'influence de rétinoïdes sur l'expression (mRNA) de la protéine Atg7 spécifique à la macroautophagie (Yoshizaki et al. 2012), et sur l'autophagie modulée par chaperons (CMA) (Anguiano et al. 2013) pourrait être étudiée aussi. Également, l'étude du flux autophagique dans le gras brun versus le gras blanc (Figure 21) sous l'influence de l'exposition au froid (Martinez-Lopez et al. 2016) et/ou des rétinoïdes (Rajawat et al. 2010), pourrait révéler d'intéressantes informations.

Sur un axe de recherche fondamentale, il est maintenant établi que même l'appareil digestif et la flore intestinale jouent un rôle dans le développement de l'obésité et du diabète (Burcelin et al. 2009, Serino et al. 2013, Serino et al. 2009). On pourrait penser à évaluer le microbiote intestinal de souris obèses, RI et diabétiques, avant et après notre traitement à l'AR. Il faut commencer par une revue de littérature qui caractérise les structures microbiotes

intestinales associées à des profils cardiométaboliques « favorables » et « défavorables ». Ainsi, nous avons écrit un article de littérature sur ces sujets : « ***Diet, food supplements and intestinal micro-flora in obesity and diabetes*** » que nous avons offert en annexes. Advenant que la microflore intestinale changeait « favorablement » après notre traitement à l'AR, cela voudrait dire que les bons effets de l'AR passent également par le « *gut microbiota* ».

Une réduction en nombre et taille des **mitochondries** suggère une augmentation de leur dynamique de « fission » précédant leur mort (Lowell and Shulman 2005, Morino et al. 2005,2008). La mort mitochondriale augmente aussi le stress oxydatif (ROS). Le stress oxydatif augmenté contribue à la résistance à l'insuline (Qatanani and Lazar 2007). On pourrait penser à évaluer la « dynamique mitochondriale » de souris obèses, RI et T2DM, avant et après notre traitement à l'AR. Il faut commencer par une revue de littérature qui caractérise les structures de « dynamique mitochondriale » associées à des profils cardiométaboliques « favorables » et « défavorables ». C'est respectivement le cas de la « fusion » et de la « fission » mitochondriales. Nous avons donc écrit un autre article de littérature sur ces sujets : « ***Mitochondrial dynamics profiles in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes*** ». Si la « dynamique mitochondriale » change favorablement « de fission vers fusion » après notre traitement à l'AR, cela prouve que l'AR touche aussi (directement ou indirectement) cette « dynamique mitochondriale », qui est concurrente au métabolisme.

Les **sirtuines** (SIR) sont en majorité des protéine-déacétylases d'histones, NAD-dépendantes impliquées aussi dans la genèse et l'efficacité mitochondriales. Les sirtuines influencent l'adaptation du métabolisme énergétique cellulaire à des changements reliés aux nutriments ou à l'âge. En contrôlant l'environnement redox de la cellule, les sirtuines pourraient limiter les dommages oxydatifs associés aux troubles métaboliques comme l'obésité, la RI et le T2DM. On pourrait penser à identifier des « profils des sirtuines » (nucléaires, cytosoliques et mitochondriaux) de souris obèses, RI et diabétiques, avant et après notre traitement à l'AR. Il faudrait commencer par une revue de littérature qui caractériserait des « profils sirtuiniques » associés à des profils cardio-métaboliques « favorables » et « défavorables ». Depuis quelques années, nous avons commencé à écrire un article de littérature sur ces sujets : « ***Sirtuins in type 2 diabetes, insulin resistance and age related metabolism disease*** », en progression actuellement. Advenant que divers « profils sirtuiniques » changeraient spécifiquement avec les

effets métaboliques favorables de notre traitement à l'AR, cela démontrerait que l'AR touche aussi (directement ou indirectement) les sirtuines.

En recherche vétérinaire ou préclinique, on pourrait considérer une étude pharmacocinétique avec des doses successives d'AR sur plusieurs groupes de souris obèses, RI et T2DM. Des analyses systémiques multiples (génomiques, protéiniques, métabolomiques, histologiques, anatomiques, physiologiques et métaboliques) inspirées de nos projets antérieurs et d'autres, pourront être envisagées. Des cages métaboliques pourraient évaluer les impacts de chaque dose d'AR sur le métabolisme énergétique, par groupe de souris et par jour. L'objectif est l'optimisation « doses-réponses » et « bénéfices-risques » pour un traitement à l'AR minimal (dose/temps), mais avec maximum d'efficacité et minimum d'effets adverses. Nous avons également écrit un tel projet et nous l'avons exposé en annexes à notre thèse.

Nous ouvrons des perspectives chez l'humain, car nous prouvons que des améliorations de profils cardiométaboliques dans l'obésité et le diabète sont possibles, même en dehors de voies de signalisation strictement contrôlées par la leptine, et/ou les hormones sexuelles. Ces hormones bénéfiques sont disfonctionnelles chez les sujets obèses, résistants à l'insuline et diabétiques, âges et respectivement diminuées après la ménopause. Nos travaux ont permis l'élaboration et l'aboutissement d'un deuxième projet de doctorat (clinique observationnel), celui de notre collègue Dr. Aurélia Sima sur la dynamique du ROL et de la RBP4 en condition d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète de type 2, avec trois autres articles, un sur la souris (Sima A et al. 2011) et deux chez l'humain (Sima A et al. 2012, 2015), dont nous sommes le co-auteurs (voir déclaration en Annexes). Les travaux de notre thèse ont également servi à développer deux projets cliniques chez l'humain obèse et résistant à l'insuline : « *Le potentiel de l'acide rétinoïque dans la prévention et le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 chez l'humain* » et « *Assessing RA efficacy against obesity and insulin resistance in humans* » exposés, droits protégés, en annexes.

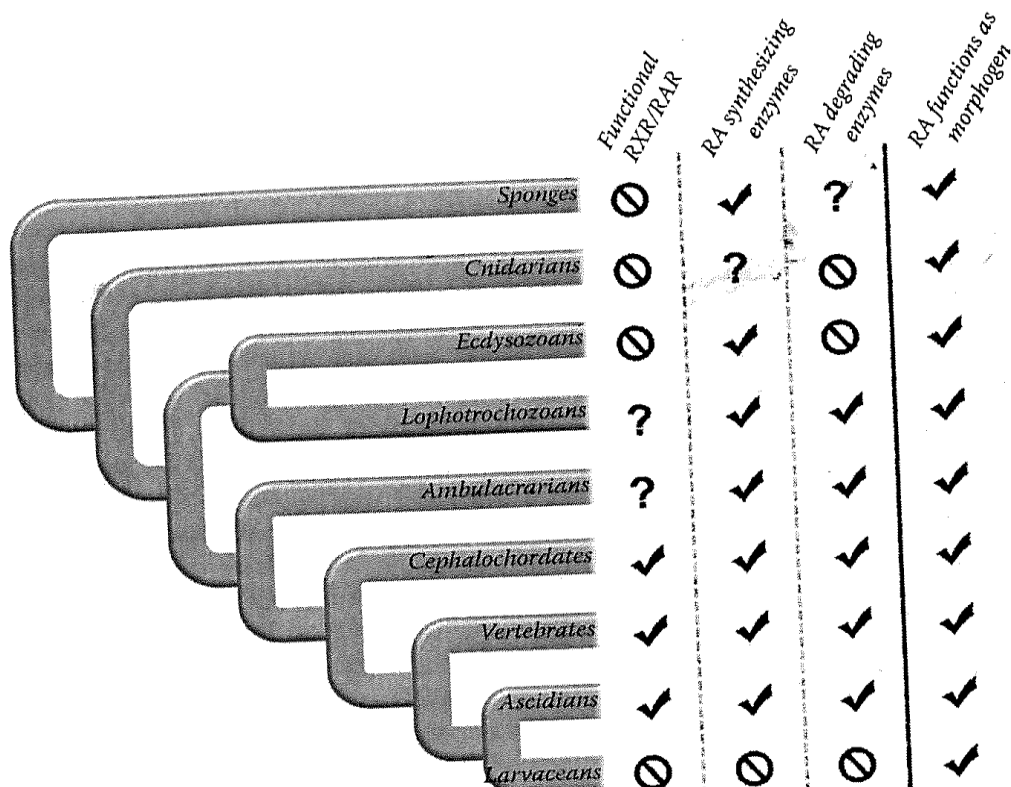
Les rétinoïdes, molécules associées, obésité, RI et diabète : de souris à l'humain

Les observations chez les rongeurs et les humains ont démontré une association entre la RBP4 et la résistance à l'insuline. Dans les études cliniques, cependant, le rôle de la RBP4 dans le développement de la résistance à l'insuline doit être mieux compris. D'autres facteurs, tels que les paramètres du syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires, devraient être

évalués dans l'établissement de la relation entre la RBP4, le rétinol (ROL), l'obésité et la résistance à l'insuline. Le profil de la vitamine A et la fonction rénale, qui affectent la RBP4 sérique, doivent être pris en compte dans les études futures. Le rôle des adipocytes blancs et bruns et du foie dans la régulation des taux sériques de RBP4 et de ROL doit être mieux compris. Les informations disponibles sur le métabolisme global du ROL dans les conditions d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète, sont encore limitées.

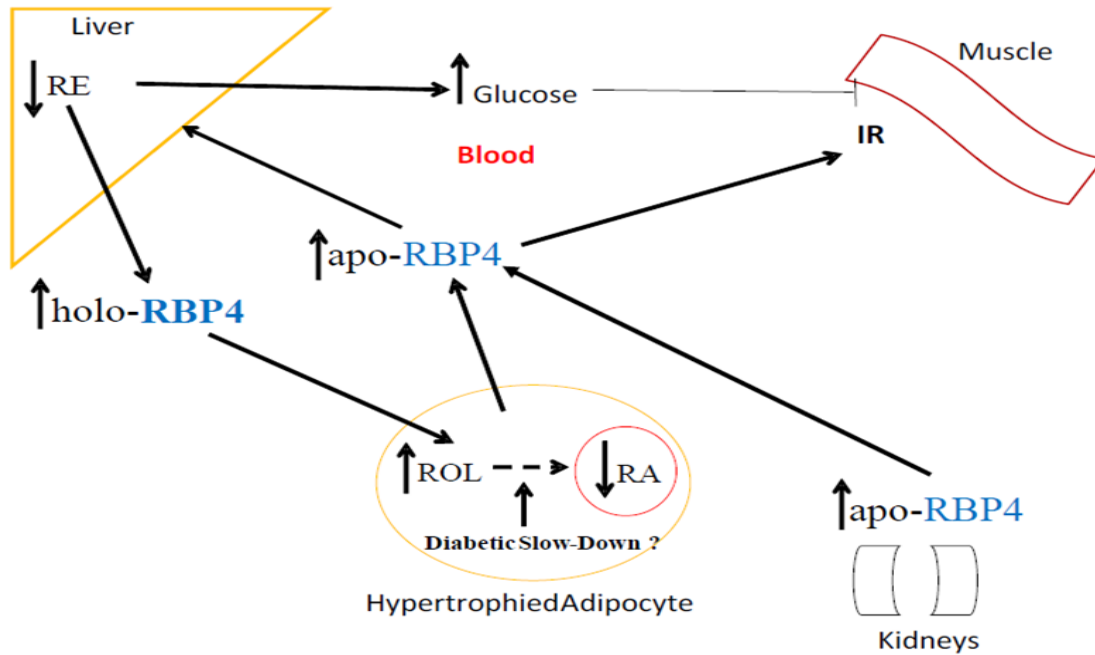
Ensemble avec notre collègue Dr. Sima Aurélia PhD. nous avons travaillé - plus sur la souris (M. Manolescu) et plus chez l'humain (Mme. Sima) - principalement sur les associations de la vitamine A (ROL-rétinol) et de son transporteur RBP4 ainsi que de l'acide rétinoïque (AR) avec l'obésité, la résistance à l'insuline (RI) et le diabète de type 2 (T2DM). Nos deux thèses se complètent ainsi harmonieusement. La nôtre s'inscrit comme préambule pour la thèse de Mme. Sima, justifiant ses travaux chez l'humain. La thèse de Mme. Sima s'inscrit comme première perspective concrétisée de notre thèse, confirmant chez l'humain plusieurs de nos résultats sur la souris. Les deux thèses préparent des futurs essais cliniques à l'AR sur l'obésité, la RI et le diabète T2DM. Selon nos études sur les souris et les humains, et en contexte de la littérature, nous dirions que, sur l'axe longitudinale de la physiopathologie du diabète de type 2, l'obésité augmente le taux sanguin de RBP4, contribuant à l'apparition de la RI. Ensuite la dyslipidémie et les lipidoses hépatiques s'installent, la RBP4 continue d'augmenter et le ROL sanguin commence à augmenter à son tour, en association avec l'apparition de l'intolérance au glucose (voir schéma plus bas). Dans le diabète avancé et très mal contrôlé (ex. : nos souris ob/ob avec des glycémies ≥ 20 mmol) les concentrations sanguines de ROL et de RBP4 sont bien plus élevées que les normales. À ce stade, selon leurs ratios (ROL/RBP4 ou RBP4/ROL), il y aurait plus de ROL que de RBP4 dans le sang. Des études futures sur le stockage, le transport et le métabolisme du ROL sur plusieurs modèles de souris obèses et RI (ex. : ob/ob, db/db, HFD) sur d'autres mammifères et des études cliniques, vont fournir plus d'informations sur la participation de la RBP4 et du ROL dans l'obésité, la RI et le diabète de type 2. D'autre part, les mammifères hibernants sont, à notre avis, un excellent modèle d'étude du métabolisme énergétique, de l'hyperphagie et de l'obésité « *metabolically healthy* » donc sans RI, ni diabète; aussi pour leur léthargie hivernale avec signalisation bêta-adrénérergique, thermogenèse adaptative, autophagie et perte de poids sans activité physique. Ils modulent ces paramètres en utilisant de grands écarts saisonniers de leptine, entre autres. Ils possèdent aussi la plus grande quantité de gras brun du

règne animal et utilisent la thermogénèse pour s'adapter au froid. Ce sont également les animaux qui accumulent le plus de vitamine A (RE, ROL) dans leur foie, dont l'AR est ensuite la forme métaboliquement active majoritaire. Ils doivent avoir des adaptations physiologiques, pour le maintien de leur masse musculaire et du métabolisme de base même en hibernation. Sans aucun doute leur microbiote intestinal change avec les variations alimentaires saisonnières.

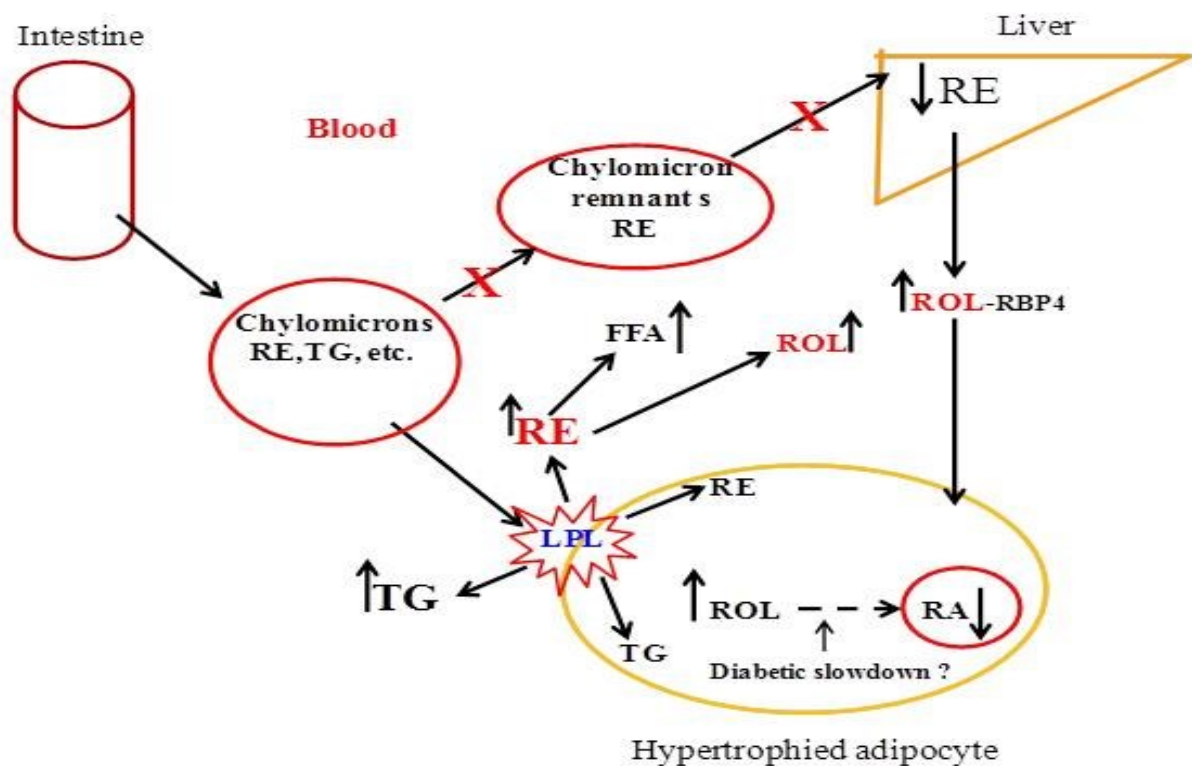


Phylogénie de l'acide rétinoïque(AR).Un aperçu. Reprise de Carvalo J.E et Schubert M. 2014 CRC-Press, disponible en libre accès, citation en original par Manolescu DC 2018sans préjudices aux droits d'auteurs, conforme aux à la FESP Université de Montréal; liste d'acronymes en début de la thèse.

RBP4, Obesity and Type 2 Diabetes



Serum Vitamin A in diabetic dyslipidemia



Dynamiques et sources de RBP4 et ROL dans l'obésité, la RI et le diabète -
de Manolescu DC. 2013, citation en accès libre, listed'acronymes en début de la thèse.

Bibliographie générale

- Abel, E. D. Peroni, O. Kim, J. K. et al. 2001 Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733.
- Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. 2005. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *Lancet Oncol* 6:712-720.
- Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. 2001. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15:226-240.
- Acin-Perez R, et al. 2010b. Control of oxidative phosphorylation by vitamin A illuminates a fundamental role in mitochondrial energy homeostasis. *FASEB J* 24:627-636.
- Acin-Perez R, Hoyos B, Gong J, Vinogradov V, Fischman DA, Leitges M, Borhan B, Starkov A, Manfredi G, Hammerling U. 2010a. Regulation of intermediary metabolism by the PKCdelta signalosome in mitochondria. *FASEB J* 24:5033-5042.
- Adams M, et al. 1997. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100:3149-3153.
- Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, L'allemand D, Spinas GA, Zimmermann MB. 2007. Serum retinol-binding protein 4 concentrations and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4359-4365.
- Akbay, E. Muslu, N. Nayir, E. et al. 2010. Serum retinol binding protein 4 levels is related with renal functions in type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 33:725-729.
- Akin F, Bastemir M, Alkış E, Kaptanoglu B. 2009. SHBG levels correlate with insulin resistance in postmenopausal women. *Eur J Intern Med.* Mar; 20 (2):162-7.
- Alemán G, Torres N, Tovar AR. 2004. [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development]. *Rev Invest Clin* 56:351-367.
- Alizadeh AM, Faghihi M, Sadeghipour HR, Mohammadghasemi F, Imani A, Houshmand F, Khorram V. 2010. Oxytocin protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via pathway involving mitochondrial ATP-dependent potassium channel. *Peptides* 31:1341-1345.
- Almasan A, Mangelsdorf DJ, Ong ES, Wahl GM, Evans RM. 1994. Chromosomal localization of the human retinoid X receptors. *Genomics* 20:397-403.
- Alvarez R, de Andrés J, Yubero P, Viñas O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. 1995. A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 270:5666-5673.
- An, C. Wang, H. Liu, X. et al. 2009. Serum retinol binding protein 4 is elevated and positively associated with insulin resistance in postmenopausal women. *Endocr J* 56:987-996.
- Anguiano J, Garner TP, Mahalingam M, Das BC, Gavathiotis E, Cuervo AM. 2013. Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives. *Nat Chem Biol* 9:374-382.
- Aranda A, Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
- Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13:2235-2246.
- Armstrong J, Redfern C, Veal G. 2005. 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success? *Biochem Pharmacol* 69:1299-1306.

- Aström A, Tavakkol A, Pettersson U, Cromie M, Elder J, Voorhees J. 1991. Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). Retinoic acid-induced expression of CRABP-II but not CRABP-I in adult human skin in vivo and in skin fibroblasts in vitro. *J Biol Chem* 266:17662-17666.
- Austin S, St-Pierre J. 2012. PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125:4963-4971.
- Azevedo PS, et al. 2010. Ventricular remodeling induced by tissue vitamin A deficiency in rats. *Cell Physiol Biochem* 26:395-402.
- Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB. 2002. betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297:843-845.
- Baehr EK, et al. 2003. Circadian phase-shifting effects of nocturnal exercise in older compared with young adults. *Am J Physiol Reg Int Comp Physiol*. Jun; 284(6):R1542-50.
- Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res*, Dec; 43 (28):2957-2958.
- Balogopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. 2007. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1971-1974.
- Balmer J, Blomhoff R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43:1773-1808.
- Balmer J, Blomhoff R. 2005. A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96:347-354.
- Bartels ED, Nielsen JM, Bisgaard LS, Goetze JP, Nielsen LB. 2010. Decreased expression of natriuretic peptides associated with lipid accumulation in cardiac ventricle of obese mice. *Endocrinology* 151:5218-5225.
- Bartelt A, Heeren J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 10:24-36.
- Bashor M, Toft D, Chytil F. 1973. In vitro binding of retinol to rat-tissue components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3483-3487.
- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. 2000a. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342.
- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Vidal H, Hainque B. 2000b. Variations in plasma soluble tumour necrosis factor receptors after diet-induced weight loss. *Diabetes Obes Metab* 2:323-325.
- Bastie JN, Despouy G, Balitrand N, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. 2001. The novel co-activator CRABP-II binds to RAR α and RXR α via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'. *FEBS Lett* 507:67-73.
- Batten ML, Imanishi Y, Maeda T, Tu DC, Moise AR, Bronson D, Possin D, Van Gelder RN, Baehr W, Palczewski K. 2004. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* 279:10422-10432.
- Bayha E, Jørgensen MC et al. 2009. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PLoS One.*, Jun 10;4(6)
- Bebea N. 1978. Metode pentru rezolvarea problemelor de optimizare-Applicatii. Editura Didactica si Pedagogica, Bucuresti, România / Roumanie / Union Européenne.
- Bernard, A. Vyskocyl, A. Mahieu, P. et al. 1988. Effect of renal insufficiency on concentration of free retinol-binding protein in urine and serum. *Clin Chim Acta* 171:85-93.
- Berry DC, Croniger CM, Ghyselinck NB, Noy N. 2012a. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-RBP receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32:3851-3859.

Berry DC, DeSantis D, Noy N. et al. 2012b. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes* 61:1112-1121.

Berry DC, Jin H, Majumdar A, Noy N. 2011. Signaling by vitamin A and RBP regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4340-4345.

Berry DC, Noy N. 2009. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 29:3286-3296.

Berry DC, Noy N. 2012. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1821:168-176.

Berry DC, O'Byrne SM, Vreeland AC, Blaner WS, Noy N. 2012c. Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32:3164-3175.

Berry DC, Soltanian H, Noy N. 2010. Repression of cellular retinoic acid-binding protein II during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 285:15324-15332.

Berry, D. C. Jin, H. Majumdar, A. et al. 2011. Signaling by vitamin A and RBP4 regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:4340-4345.

Bertram J, Vine A. 2005. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochim Biophys Acta* 1740:170-178.

Bhat P, Lacroix A. 1983a. Metabolism of [11-3H] retinyl acetate in liver tissues of vitamin A-sufficient, -deficient and retinoic acid-supplemented rats. *Biochim Biophys Acta* 752:451-459.

Bhat P, Lacroix A. 1986. Separation of geometric isomers of retinol and retinoic acid in nonaqueous high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 123:75-85.

Bhat P, Lacroix A. 1989. Metabolism of retinol and retinoic acid in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in rats. *Cancer Res* 49:139-144.

Bhat P, Lacroix A. 1991a. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol* 69:826-830.

Bhat P, Manolescu D. 2008. Role of vitamin A in determining nephron mass and possible relationship to hypertension. *J Nutr* 138:1407-1410.

Bhat P, Marcinkiewicz M, Li Y, Mader S. 1998. Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat. *J Histochem Cytochem* 46:1025-1032.

Bhat PV, Lacroix A. 1983b. Separation and estimation of retinyl fatty acyl esters in tissues of normal rat by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 272:269-278.

Bhat PV, Lacroix A. 1991b. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol* 69:826-830.

Bhat, P.V. 2005. Role of retinol dehydrogenase type 1 (RALDH1) in retinoic acid biosynthesis. *Enzymol Mol Biol* 12:66-72.

Biesalski HK, Frank J, Beck SC, Heinrich F, Illek B, Reifen R, Gollnick H, Seeliger MW, Wissinger B, Zrenner E. 1999. Biochemical but not clinical vitamin A deficiency results from mutations in the gene for retinol binding protein. *Am J Clin Nutr* 69:931-936.

Blaak EE, van Aggel-Leijssen DP, Wagenmakers AJ, Saris WH, van Baak MA. 2000a. Impaired oxidation of plasma-derived fatty acids in type 2 diabetic subjects during moderate-intensity exercise. *Diabetes* 49:2102-2107.

Blaak EE, Wagenmakers AJ, Glatz JF, Wolffenbuttel BH, Kemerink GJ, Langenberg CJ, Heidendal GA, Saris WH. 2000b. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E146-154.

- Blaner W, Das K, Mertz J, Das S, Goodman D. 1986. Effects of dietary retinoic acid on cellular retinol- and retinoic acid-binding protein levels in various rat tissues. *J Lipid Res* 27:1084-1088.
- Blaner W, O'Byrne S, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio D, Jiang H, Schwabe R, Hillman E, Piantadosi R, Libien J. 2009. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 1791:467-473.
- Blaner W. 2007. STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab* 5:164-166.
- Blaner W. 2001. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45:S129-135.
- Blaner WS. 1989. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 10:308-316.
- Blaner, W. S. and Goodman, D. S. 1990. Purification and properties of plasma retinol-binding protein. *Methods Enzymol* 189:193-206.
- Blomhoff R, Blomhoff H. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66:606-630.
- Blomhoff R, Green M, Green J, Berg T, Norum K. 1991. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 71:951-990.
- Blomhoff R, Green M, Norum K. 1992. Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr* 12:37-57.
- Blomhoff R. 1994. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 52:S13-23.
- Bobbert, P. Weithauser, A. Andres, J. et al. 2009. Increased plasma retinol binding protein 4 levels in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 11:1163-1168.
- Bonet ML, Oliver J, Picó C, Felipe F, Ribot J, Cinti S, Palou A. 2000. Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J Endocrinol* 166:511-517.
- Bonet ML, Oliver P, Palou A. 2013. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1831:969-985.
- Bonet ML, Ribot J, Felipe F, Palou A. 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci* 60:1311-1321.
- Bonet ML, Ribot J, Palou A. 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1821:177-189.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 118:789-800.
- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S. 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 122:1022-1036.
- Botnariuc, N. 1976. Concepția și metoda sistemică în biologia generală. Editura Academiei Republicii Socialiste România, Bucharest.
- Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Décimo D, Dollé P, Chambon P. 1997. Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev* 63:173-186.
- Bouzakri K, Roques M, Debarb C, Berbe V, Rieusset J, Laville M, Vidal H. 2004. WY-14643 and 9-cis-retinoic acid induce IRS-2/PI 3-kinase signalling pathway and increase glucose transport in human skeletal muscle cells: differential effect in myotubes from healthy subjects and Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:1314-1323.

Boylan J, Gudas L. 1992a. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267:21486-21491.

Boylan JF, Gudas LJ. 1992b. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267:21486-21491.

Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, Rieusset J. 2011. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E581-591.

Broch, M. Gomez, J. M. Auguet, M. T. et al. 2010. Association of retinol-binding protein-4 (RBP4) with lipid parameters in obese women. *Obes Surg* 20:1258-1264.

Broch, M. Vendrell, J. Ricart, W. et al. 2007. Circulating RBP-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese. *Diabetes Care* 30:1802-1806.

Brodeur H, Chagnon S, Parisotto M, Mader S, Bhat P. 2006. Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers. *Biochem Cell Biol* 84:799-804.

Brodeur H, Gagnon I, Mader S, Bhat P. 2003. Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J Lipid Res* 44:303-313.

Brun PJ, Wongsiriroj N, Blaner WS. 2016. Retinoids in the pancreas. *Hepatobiliary Surg Nutr* 5:1-14.

Brun PJ, Yang KJ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. 2013. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors* 39:151-163.

Budhu A, Noy N. 2002. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22:2632-2641.

Burcelin R, Luche E, Serino M, Amar J. 2009. The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? *Front Biosci* 14:5107-5117.

Buyukbese MA, Cetinkaya A, Tarakcioglu M et al. 2004. Leptin levels in obese women with and without type 2 diabetes mellitus. *Mediators Inflamm*, Dec; 13 (5-6):321-5.

Cabre, A. Lazaro, I. Girona, J. et al. 2007. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med* 262:496-503.

Calderon-Dominguez M, Mir JF, Herrero L. et al. 2015. Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte*, Dec 10;5(2):98-118.

Calderon-Dominguez M, Sebastián D, Herrero L. et al. 2016. Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. *PLoS One*. Jul 20; 11 (7)

Cao L, Gardner DG. 1995. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 25:227-234.

Caprioli A, Zhu H, Sato TN. 2004. CRBP-III: lacZ expression pattern reveals a novel heterogeneity of vascular endothelial cells. *Genesis* 40:139-145.

Casteilla L, Pénicaud L, Cousin B, Calise D. 2008. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity. *Methods Mol Biol* 456:23-38.

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Silva C, Rotellar F, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Frühbeck G. 2009a. Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. *J Mol Med (Berl)* 87:803-813.

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Salvador J, Frühbeck G. 2009b. Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity. *Expert Opin Pharmacother* 10:239-254.

Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.

- Chambon P. 2004. 2005. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* 19:1418-1428.
- Chambon P. 2004. How I became one of the fathers of a superfamily. *Nat Med* 10:1027-1031.
- Chan, T. F. Tsai, Y. C. Wu, C. H. et al. 2011. The positive correlation between cord serum retinol-binding protein 4 concentrations and fetal growth. *Gynecol Obstet Invest* 72:98-102.
- Chang, Y. H. Lin, K. D. Wang, C. L. et al. 2008. Elevated serum RBP4 are associated with renal dysfunction and uric acid in T2DM patients. *Diabetes Metab Res Rev* 24:629-634.
- Chavez, A. O. Coletta, D. K. Kamath, S. et al. 2009. Retinol-binding protein 4 is associated with impaired glucose tolerance but not with whole body or hepatic insulin resistance in Mexican Americans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E758-E764.
- Chehab FF1, Lim ME, Lu R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin. *Nat Genet.* Mar;12(3):318-20.
- Chen HY, Liu Q, Salter AM, Lomax MA. 2013. Synergism between cAMP and PPAR γ Signalling in the Initiation of UCP1 Gene Expression in HIB1B Brown Adipocytes. *PPAR Res.* 476049.
- Chen M, Thomson AB, Tsin AT, Basu TK. 2003. The hepatic retinyl ester hydrolase activity is depressed at the onset of diabetes in BB rats. *Br J Nutr* 89:231-238.
- Chertow BS, Baker GR. 1978. The effects of vitamin A on insulin release and glucose oxidation in isolated rat islets. *Endocrinology* 103:1562-1572.
- Chertow, B. S. Blaner, W. S. Baranetsky, N. G. et al. 1987. Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in isolated islets. *J Clin Invest* 79:163-169.
- Chiefari E, Paonessa, F. Liritano, S. et al. 2009. The cAMP-HMGA1-RBP4 system: a novel biochemical pathway for modulating glucose homeostasis. *BMC Biol* 7:24.
- Chiu HJ, Fischman DA, Hammerling U. 2008. Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation. *FASEB J* 22:3878-3887.
- Cho, Y. M. Youn, B. S. Lee, H. et al. 2006. Plasma RBP4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and T2DM. *Diabetes Care* 29:2457-2461.
- Choi, K. M. Yannakoulia, M. Park, M. S. et al. 2011. Serum adipocyte fatty acid-binding protein, RBP 4, and adiponectin concentrations in relation to the development of the metabolic syndrome in Korean boys: a 3-y prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 93:19-26.
- Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Daniel M, Fenaux P, Castaigne S, Degos L. 1990. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood* 76:1710-1717.
- Choudhary R, Baker KM, Pan J. 2008a. All-trans retinoic acid prevents angiotensin II- and mechanical stretch-induced reactive oxygen species generation and cardiomyocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 215:172-181.
- Choudhary R, Palm-Leis A, Scott RC, Guleria RS, Rachut E, Baker KM, Pan J. 2008b. All-trans retinoic acid prevents development of cardiac remodeling in aortic banded rats by inhibiting the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H633-644.
- Christou GA, Tellis CC, Elisaf MS, Tselepis AD, Kiortsis DN. 2012. The changes in plasma retinol-binding protein 4 levels are associated with those of the apolipoprotein B-containing lipoproteins during dietary and drug treatment. *Angiology* 63:67-75.
- Clagett-Dame M, DeLuca HF. 2002. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 22:347-381.
- Conroy, R. Espinal, Y. Fennoy, I. et al. 2011. RBP 4 is associated with adiposity-related comorbidity risk factors in children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 24:913-919.
- Cooper AD. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 38:2173-2192.

- Craig, R. L. Chu, W. S. and Elbein S. C. 2007. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol Genet Metab* 90:338-344.
- D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3:63-103.
- Danalache BA, Paquin J, Donghao W, Grygorczyk R, Moore JC, Mummery CL, Gutkowska J, Jankowski M. 2007. Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis. *Stem Cells* 25:679-688.
- Dantzig, G.B (1947), "Maximization of a linear function of variables subject to linear inequalities, T.C. Koopmans (ed.): *Activity Analysis of Production and Allocation*", New York-London 1951 (Wiley & Chapman-Hall), pp. 339-347.
- Davidovici B, Tüzün Y, Wolf R. 2007. Retinoid receptors. *Dermatol Clin.* 25:525-530.
- De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28:89-94.
- De Botton S, et al. 2005. Autologous and allogeneic stem-cell transplantation as salvage treatment of acute promyelocytic leukemia initially treated with all-trans-RA: a retrospective analysis of the European acute promyelocytic leukemia group. *J Clin Oncol* 23:120-126.
- De Leenheer AP, Lambert WE, Claeys I. 1982. All-trans-retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 23:1362-1367.
- De Luca L, Sasak W, Adamo S, Bhat P, Akalovsky I, Silverman-Jones C, Maestri N. 1980. Retinoid metabolism and mode of action. *Environ Health Perspect* 35:147-152.
- De Luca LM. 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 5:2924-2933.
- De Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. 1991. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66:675-684.
- Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B, Boirie Y, Vidal H. 2004. Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:917-925.
- Deblon N, et al. 2011. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. *PLoS One* 6:e25565.
- DeFronzo RA. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787-835.
- DeFronzo, R. A. 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes gene. *Diabetes Rev* 5:171-269.
- Deltour L, Foglio M, Duester G. 1999. Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem* 274:16796-16801.
- Delva L, Bastie J, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C. 1999. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19:7158-7167.
- Deshmukh DS, Malathi P, Subba Rao K, Ganguly J. 1964. Absorption of retinoic acid (vitamin A acid) in rats. *Indian J Biochem* 1:164-166.
- Dimaculangan DD, Chawla A, Boak A, Kagan HM, Lazar MA. 1994. Retinoic acid prevents downregulation of ras resection gene/lysyl oxidase early in adipocyte differentiation. *Differentiation* 58:47-52.
- Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. 1999. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 274:23695-23698.

- Doshi SM, Friedman AN. 2017. Diagnosis and Management of Type 2 Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. Aug 7;12(8):1366-1373.
- DOWLING JE, WALD G. 1960. The role of vitamin A acid. *Vitam Horm* 18:515-541.
- Drel VR, Mashtalir N, Illytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG. 2006. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 55:3335-3343.
- Duester G, Mic F, Molotkov A. 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143-144:201-210.
- Duester G. 1996. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267:4315-4324.
- Duester G. 1996. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35:12221-12227.
- Dunagin PE, Zachman RD, Olson JA. 1964. Identification of free and conjugated retinoic acid as a product of retinal (vitamin A aldehyde) metabolism in the rat in vivo. *Biochim Biophys Acta* 90:432-434.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27:79-101.
- E X, Zhang L, Lu J, Tso P, Blaner W, Levin M, Li E. 2002. Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *J Biol Chem* 277:36617-36623.
- Eckertova M, Ondrejčáková M, Krsková K, Zorad S, Jezová D. 2011. Subchronic treatment of rats with oxytocin results in improved adipocyte differentiation and increased gene expression of factors involved in adipogenesis. *Br J Pharmacol* 162:452-463.
- El Kares R, Manolescu DC, Lakhal-Chaieb L, Montpetit A, Zhang Z, Bhat PV, Goodyer P. 2010. A human ALDH1A2 gene variant is associated with increased newborn kidney size and serum retinoic acid. *Kidney Int* 78:96-102.
- Enerbäck S. 2009. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med* 360:2021-2023.
- Enerbäck S. 2010a. Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond)* 34 Suppl 1:S43-46.
- Enerbäck S. 2010b. Human brown adipose tissue. *Cell Metab* 11:248-252.
- Engeli S, et al. 2012. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin Invest* 122:4675-4679.
- Erikstrup C, et al. 2009. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 11:204-212.
- Erikstrup, C. Mortensen, O. H. Nielsen, A. R. 2008. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 11:204-212.
- Everts H, Sundberg J, Ong D. 2005. Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat. *Exp Cell Res* 308:309-319.
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. 2004. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 53:882-889.
- Fernandez-Real, J. M. Moreno, J. M. and Ricart, W. 2008. Circulating RBP4 concentration might reflect insulin resistance-associated iron overload. *Diabetes* 57:1918-1925.
- Fierce Y, de Moraes Vieira M, Piantadosi R, Wyss A, Blaner W, Paik J. 2008. In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch Biochem Biophys* 472:126-138.
- Fiorella P, Napoli J. 1994. Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. *J Biol Chem* 269:10538-10544.

- Florian M, Jankowski M, Gutkowska J. 2010. Oxytocin increases glucose uptake in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 151:482-491.
- Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, Klein R, Association AD. 2003. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 26:226-229.
- Fraser P, Bramley P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43:228-265.
- Frayn KN, Arner P, Yki-Järvinen H. 2006. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem* 42:89-103.
- Freemantle S, Spinella M, Dmitrovsky E. 2003. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 22:7305-7315.
- Frey SK, Vogel S. 2011. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients* 3:27-39.
- Freytag TL, Liu SM, Rogers QR, Morris JG. 2003. Teratogenic effects of chronic ingestion of high levels of vitamin A in cats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. Feb;87(1-2):42-51.
- Friebe, D. Neef, M. Erbs, S. et al. 2011. Retinol binding protein 4 (RBP4) is primarily associated with adipose tissue mass in children. *Int J Pediat Obes* 6:e346-e352.
- Frolik CA, Roberts AB, Tavela TE, Roller PP, Newton DL, Sporn MB. 1979. Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxoretinoic acid. In vitro metabolites of all-trans-retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry* 18:2092-2097.
- Furtado LM, Somwar R, Sweeney G, Niu W, Klip A. 2002. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol* 80:569-578.
- Gagnon I, Duester G, Bhat P. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* 1596:156-162.
- Gagnon I, Duester G, Bhat P. 2003. Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem Pharmacol* 65:1685-1690.
- Galloway CA, Lee H, Nejjar S, Jhun BS, Yu T, Hsu W, Yoon Y. 2012a. Transgenic control of mitochondrial fission induces mitochondrial uncoupling and relieves diabetic oxidative stress. *Diabetes* 61:2093-2104.
- Galloway CA, Lee H, Yoon Y. 2012b. Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radic Biol Med* 53:2218-2228.
- Galloway CA, Yoon Y. 2012a. Mitochondrial Morphology in Metabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal*.
- Galloway CA, Yoon Y. 2012b. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: what comes first, misshape or dysfunction? The view from metabolic excess. *J Gen Physiol* 139:455-463.
- Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1886-1890.
- Genuth SM, Przybylski RJ, Rosenberg DM. 1971. Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice. *Endocrinology* 88:1230-1238.
- Gerdes, S. Osadtschy, S. Rostami-Yazdi, M. et al. 2012. Leptin, adiponectin, visfatin and RBP4-mediators of comorbidities in patients with psoriasis. *Exp Dermatol* 21:43-47.
- Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. 2006. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6676-6681.
- Ghyselinck N, et al. 1999. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 18:4903-4914.

- Giguere V, Ong E, Segui P, Evans R. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.
- Giguère V. 1994. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15:61-79.
- Goldman AL. 1992, Hypervitaminosis A in cat, *J Am Vet Med Assoc.* Jun 15; 200 (12):1970-2.
- Goldston & Hoskins 1995. *Geriatrics & Gerontology of the Dog & Cat.*
- Goodman D, Blomstrand R, Werner B, Huang H, Shiratori T. 1966. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *J Clin Invest* 45:1615-1623.
- Goodman DS. 1974. Vitamin A transport and retinol-binding protein metabolism. *Vitam Horm* 32:167-180.
- Goodman DS. 1982. Retinoid-binding proteins. *J Am Acad Dermatol* 6:583-590.
- Goodman, D. S. 1974. Vitamin A transport and RBP metabolism. *Vitam Horm* 32:167-180.
- Goodman, E. Graham, T. E. Dolan, L. M. et al. 2009. The relationship of RBP4 to changes in insulin IR and cardiometabolic risk in overweight black adolescents. *J Pediatr* 154:67-73.
- Goodyer P, et al. 2007. Effects of maternal vitamin A status on kidney development: a pilot study. *Pediatr Nephrol* 22:209-214.
- Gorry P, Lufkin T, Dierich A, Rochette-Egly C, Décimo D, Dollé P, Mark M, Durand B, Chambon P. 1994. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9032-9036.
- Gottesman M, Quadro L, Blaner W. 2001a. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23:409-419.
- Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. 2001b. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23:409-419.
- Graham C, Brocklehurst K, Pickersgill R, Warren M. 2006a. Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *Biochem J* 394:67-75.
- Graham T, et al. 2006b. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.
- Graham TE, et al. 2006c. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.
- Graham, T. E. Wason, C. J. Bluher, M. et al. 2007. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum RBP4 in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* 50:814-823.
- Graham, T. E. Yang, Q. Bluher, M. et al. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.
- Green M, Green J, Berg T, Norum K, Blomhoff R. 1993. Vitamin A metabolism in rat liver: a kinetic model. *Am J Physiol* 264:G509-521.
- Groscolas R1, Herzberg GR.1997. Fasting-induced selective mobilization of brown adipose tissue fatty acids. *J Lipid Res.* Feb;38(2):228-38.
- Gu X1. et al. 2005 Molecular cloning and expression of a novel CYP26 gene (cyp26d1) during zebrafish early development. *Gene Expr Patterns.* 2005 Aug;5(6):733-9.
- Gutkowska J, Broderick TL, Bogdan D, Wang D, Lavoie JM, Jankowski M. 2009. Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: possible implications in cardiomyopathy. *J Physiol* 587:4725-4736.
- Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. 1997. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11704-11709.
- Gutkowska J, Paquette A, Wang D, Lavoie JM, Jankowski M. 2007. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R267-275.

- Haferlach T, Löffler H, Glass B, Gassmann W. 1993. Repeated complete remission in a patient with acute promyelocytic leukemia after treatment with 13-cis-retinoic acid first and with all-trans-retinoic acid in relapse. *Clin Investig* 71:774-779.
- Haffner C, et al. 2004. Structure-based design of potent retinoid X receptor alpha agonists. *J Med Chem* 47:2010-2029.
- Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. 2007. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1168-1171.
- Hammerling U. 2016. Retinol as electron carrier in redox signaling, a new frontier in vitamin A research. *Hepatobiliary Surg Nutr* 5:15-28.
- Han, S. H. Chin, B. S. Lee, H. S. et al. 2009. Serum retinol-binding protein 4 correlates with obesity, insulin resistance, and dyslipidemia in HIV-infected subjects receiving highly active antiretroviral therapy. *Metabolism* 58:1523-1529
- Harrison E. 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25:87-103.
- Hatcher JP, Jones DN, Rogers DC, Hatcher PD, Reavill C, Hagan JJ, Hunter AJ. 2001. Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res* 125:43-47.
- He Y, Huang Y, Zhou L, Lu LM, Zhu YC, Yao T. 2006. All-trans retinoic acid inhibited angiotensin II-induced increase in cell growth and collagen secretion of neonatal cardiac fibroblasts. *Acta Pharmacol Sin* 27:423-429.
- Henze, A. Frey, S. K. Reila, J. et al. 2008. Evidence that kidney function but not type 2 diabetes determines retinol-binding protein 4 serum levels. *Diabetes* 57:3323-3326.
- Henze, A. Raila, J. Kempf, C. et al. 2011. Vitamin A metabolism is changed in donors after living kidney transplantation: an observational study. *Lipids Health Dis* 10:231.
- Hermisdorff, H. H. Zulet, M. A. Puchau, B. et al. 2010. Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults. *Inflammation* 34:161-170.
- Hessel S, et al. 2007. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* 282:33553-33561.
- Heyman R, Mangelsdorf D, Dyck J, Stein R, Eichele G, Evans R, Thaller C. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68:397-406.
- Hindle AK, Edwards C, McCaffrey T, Fu S, Brody F. 2010. Identification of cardiovascular genes in omentum from morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 34:1020-1027.
- Hollander D. 1981. Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K. *J Lab Clin Med* 97:449-462.
- Hsu L, Chang W, Hiraoka L, Hsieh C. 1994. Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6. *Genomics* 24:333-341.
- Hu, C. Jia, W. Zang, R. et al. 2008. Effect of RBP4 gene variants on circulating RBP4 concentration and type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabetes Medicine*.
- Huang Y, Wright CD, Kobayashi S, Healy CL, Elgethun M, Cypher A, Liang Q, O'Connell TD. 2008. GATA4 is a survival factor in adult cardiac myocytes but is not required for alpha1A-adrenergic receptor survival signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H699-707.
- Hussain MM, Maxfield FR, Más-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW. 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 266:13936-13940.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. 1999. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:879-886.

- Ingelsson, E. Sundstrom, J. Melhus, H. et al. 2009. Circulating RBP4, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease in elderly. *Atherosclerosis*. 206:239-244.
- Isken A, Golczak M, Oberhauser V, Hunzelmann S, Driever W, Imanishi Y, Palczewski K, von Lintig J. 2008. RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab* 7:258-268.
- Jaconi, S. Saurat, J. H. and Siegenthaler, G. 1996. Analysis of normal and truncated holo- and apo-RBP in human serum: altered ratios in chronic renal failure. *Eur J Endocrinol* 134:576-582.
- James AM, Collins Y, Logan A, Murphy MP. 2012. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 23:429-434.
- James WP. 2008a. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 263:336-352.
- James WP. 2008b. The fundamental drivers of the obesity epidemic. *Obes Rev* 9 Suppl 1:6-13.
- James WP. 2008c. WHO recognition of the global obesity epidemic. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7:S120-126.
- Janke, J. Engeli, S. Boschmann, M. et al. 2006. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 55:2805-2810.
- Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, Paquin J, McCann SM, Gutkowska J. 2004. Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13074-13079.
- Jankowski M, et al. 2010a. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 105:205-218.
- Jankowski M, Wang D, Danalache B, Gangal M, Gutkowska J. 2010b. Cardiac oxytocin receptor blockade stimulates adverse cardiac remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H265-274.
- Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, Joosten LA, Netea MG, Tack CJ, Stienstra R. 2012. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 153:5866-5874.
- Jaspard E, Hunault G. 2014. Comparison of amino acids physico-chemical properties and usage of late embryogenesis abundant proteins, hydrophilins and WHy domain. *PLoS One*. Oct 8;9(10)
- Jeyakumar SM, Sheril A, Vajreswari A. 2017 Vitamin A Improves Hyperglycemia and Glucose-Intolerance through Regulation of Intracellular Signaling Pathways and Glycogen Synthesis in WNIN/GR-Ob Obese Rat Model. *Prev Nutr Food Sci*. Sep; 22(3):172-183.
- Jeyakumar SM, Vajreswari A, Giridharan NV. 2008. Vitamin A regulates obesity in WNIN/Ob obese rat; independent of stearoyl-CoA desaturase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 370:243-247.
- Jeyakumar SM, Vijaya Kumar P, Giridharan NV, Vajreswari A. 2011. Vitamin A improves insulin sensitivity by increasing insulin receptor phosphorylation through protein tyrosine phosphatase 1B regulation at early age in obese rats of WNIN/Ob strain. *Diabetes Obes Metab* 13:955-958.
- Jia, W. Wu, H. Bao, Y. et al. 2007. Association of serum RBP4 and visceral adiposity in Chinese subjects with and without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3224-3229.
- Jiang W, Napoli JL. 2013. The retinol dehydrogenase Rdh10 localizes to lipid droplets during acyl ester biosynthesis. *J Biol Chem* 288:589-597.
- Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481.
- Kakizuka A, Miller WH, Umesono K, Warrell RP, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66:663-674.
- Kanai M, Raz A, Goodman DS. 1968. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47:2025-2044.

- Kane MA, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Krois CR, Ryu JY, Cione E, Napoli JL. 2011. Crbpl modulates glucose homeostasis and pancreas 9-cis-retinoic acid concentrations. *Mol Cell Biol* 31:3277-3285.
- Kane MA, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Obrochta KM, Krois CR, Cione E, Ryu JY, Napoli JL. 2010. Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21884-21889.
- Kannel WB, Zhang T, Garrison RJ. 1990. Is obesity-related hypertension less of a cardiovascular risk? The Framingham Study. *Am Heart J* 120:1195-1201.
- Kavanagh K, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65:3895-3906.
- Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315:820-825.
- Keilson B, Underwood BA, Loerch JD. 1979. Effects of retinoic acid on the mobilization of vitamin A from the liver in rats. *J Nutr* 109:787-795.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950.
- Kelly KR, Kashyap SR, O'Leary VB, Major J, Schauer PR, Kirwan JP. 2010. Retinol-binding protein 4 (RBP4) protein expression is increased in omental adipose tissue of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 18:663-666.
- Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556.
- Kiefer FW, et al. 2012. Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med* 18:918-925.
- Kim C. 2008. Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:289-294.
- Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong D, Li C, van de Rijn M, Brooks J, Pollack J. 2005. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res* 65:8118-8124.
- Kim KH, Lee MS. 2014. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 10:322-337.
- Kim, I. K. Lee, H.J. Kang, J. H. et al. 2011. Relationship of serum RBP4 with weight status and lipid profile among Korean children and adult. *Eur J Clin Nutr* 65:226-233.
- Klaus S, Münzberg H, Trüloff C, Heldmaier G. 1998. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am J Physiol* 274:R287-293.
- Klein DJ, Aronson Friedman L, Harlan WR, Barton BA, Schreiber GB, Cohen RM, Harlan LC, Morrison JA. 2004. Obesity and the development of insulin resistance and impaired fasting glucose in black and white adolescent girls: a longitudinal study. *Diabetes Care* 27:378-383.
- Klein, K. Bancher-Todesca, D. Leipold, H. et al. 2010. Retinol-binding protein 4 in patients with gestational diabetes mellitus. *J Womens Health* 19:517-521.
- Klötting N, et al. 2007. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6:79-87.
- Klötting, N. Fasshauer, M. Deitrich, A. et al. 2010. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E506-E515.
- Kobayashi H, et al. 2009. Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 54:510-519.

- Kobayashi S, Mao K, Zheng H, Wang X, Patterson C, O'Connell TD, Liang Q. 2007. Diminished GATA4 protein levels contribute to hyperglycemia-induced cardiomyocyte injury. *J Biol Chem* 282:21945-21952.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. 2010. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J* 24:3052-3065.
- Korichneva I, Waka J, Hammerling U. 2003. Regulation of the cardiac mitochondrial membrane potential by retinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 305:426-433.
- Kovacs P, et al. 2007. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein-4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes* 56:3095-3100.
- Kovsan J, et al. 2011. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E268-277.
- Krzyzanowska K, Zemany L, Krugluger W, Schernthaner GH, Mittermayer F, Schnack C, Rahman R, Brix J, Kahn BB, Schernthaner G. 2008. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia* 51:1115-1122.
- Ku, Y. H. Han, K. A. Ahn, H. et al. 2010. Resistance exercise did not alter intramuscular adipose tissue but reduced retinol-binding protein-4 concentration in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Intl Med Res* 38:782-791.
- Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS. 1995. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* 270:17850-17857.
- Kuroshima A. 1993. Brown adipose tissue thermogenesis as physiological strategy for adaptation. *Jpn J Physiol* 43:117-139.
- Kuzmicki, M. Telejko, B. Wawrusiewicz-Kurylonek, N. et al. 2011. RBP4 in adipose and placental tissue of women with gestational diabetes. *Gynecol Endocrinol* 27:1065-1069.
- Labrecque J, Dumas F, Lacroix A, Bhat P. 1995. A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem J* 305 (Pt 2):681-684.
- Labrecque, J. Dumas, F. Lacroix, A. et al. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans RA. *Biochem J* 305:681-684.
- Lafontan M, Moro C, Sengenès C, Galitzky J, Crampes F, Berlan M. 2005. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides: the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2032-2042.
- Lampen A, Meyer S, Nau H. 2001. Effects of receptor-selective retinoids on CYP26 gene expression and metabolism of all-trans-retinoic acid in intestinal cells. *Drug Metab Dispos* 29:742-747.
- Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P. 1995. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121:539-548.
- Landrier JF, Marcotrichino J, Tourniaire F. 2012. Lipophilic micronutrients and adipose tissue biology. *Nutrients* 4:1622-1649.
- Landsberg L, Young JB, Leonard WR, Linsenmeier RA, Turek FW. 2009. Do the obese have lower body temperatures? A new look at a forgotten variable in energy balance. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120:287-295.
- Larose M, Cassard-Doulcier AM, Fleury C, Serra F, Champigny O, Bouillaud F, Ricquier D. 1996. Essential cis-acting elements in rat uncoupling protein gene are in an enhancer containing a complex retinoic acid response domain. *J Biol Chem* 271:31533-31542.
- Laukola Sisko 1980. Seasonal changes in the fatty acids spectrum of the hedgehog's white and brown adipose tissue. *Ann.Zool.Fenici* 17:191-201.1980

- Lebovitz HE, Banerji MA. 2001. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog Horm Res* 56:265-410.
- Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, Rappaport EB, Freed MI, Group RCTS. 2001. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:280-288.
- Lee YK, Cowan CA. 2014. Differentiation of white and brown adipocytes from human pluripotent stem cells. *Methods Enzymol* 538:35-47.
- Lee YM1, Lee JO. et al. 2008. Retinoic acid leads to cytoskeletal rearrangement through AMPK-Rac1 and stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. Dec 5; 283(49):33969-74.
- Lee, D. C. Lee, J. W. and Im J. A. 2007. Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents. *Metabolism* 56:327-331.
- Lee, J. W. Im, J. A. Lee, H. R. et al. 2007. Visceral adiposity is associated with serum retinol binding protein-4 levels in healthy women. *Obesity* 15:2225-2232.
- Lee, J. W. Lee, H. R. Shim, J. Y. et al. 2008. Abdominal visceral fat reduction is associated with favourable changes of serum RBP4 in nondiabetic subjects. *Endocrine J* 55:811-818.
- Leid M, Kastner P, Chambon P. 1992. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* 17:427-433.
- Lengfelder E, Saussele S, Weisser A, Büchner T, Hehlmann R. 2005. Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 56:261-274.
- Lenhard JM. 2001. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels* 7:249-258.
- Lenhard, J. M. 2001. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels* 7:248-258.
- Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. 1991. Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10138-10142.
- Lewis KC, Green MH, Underwood BA. 1981. Vitamin A turnover in rats as influenced by vitamin A status. *J Nutr* 111:1135-1144.
- Li E, Norris A. 1996. Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 16:205-234.
- Li Y, Wongsiriroj N, Blaner WS. 2014. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3:126-139.
- Libien J, Blaner WS. 2007. Retinol and retinol-binding protein in cerebrospinal fluid: can vitamin A take the "idiopathic" out of idiopathic intracranial hypertension? *J Neuroophthalmol* 27:253-257.
- Lidell ME, Betz MJ, Enerbäck S. 2014. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte* 3:63-66.
- Lidell ME, et al. 2013. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19:631-634.
- Lidén M, Eriksson U. 2005. Development of a versatile reporter assay for studies of retinol uptake and metabolism in vivo. *Exp Cell Res* 310:401-408.
- Lim S, Choi SH, Jeong IK, Kim JH, Moon MK, Park KS, Lee HK, Kim YB, Jang HC. 2008. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol-binding protein-4 concentrations in young and middle-aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2263-2268.
- Lim, S. Yoon, J. W. Choi, S. H. et al. 2010. Combined impact of adiponectin and retinol-binding protein 4 on metabolic syndrome in elderly people: the Korean longitudinal study on health and aging. *Obesity* 18:826-832.

- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. 2003. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 278:9856-9861.
- Liu HX, Ly I, Hu Y, Wan YJ. 2014. Retinoic acid regulates cell cycle genes and accelerates normal mouse liver regeneration. *Biochem Pharmacol* 91:256-265.
- Lladó I1, Pons A, Palou A. 1997. Fatty acid composition of brown adipose tissue in dietary obese rats. *Biochem Mol Biol Int. Dec*; 43(5):1129-36.
- Lobo GP, Amengual J, Li HN, Golczak M, Bonet ML, Palczewski K, von Lintig J. 2010. Beta, beta-carotene decreases peroxisome proliferator receptor gamma activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a beta, beta-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J Biol Chem* 285:27891-27899.
- Lowell BB, Shulman GI. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387.
- Lu L, Yao T, Zhu YZ, Huang GY, Cao YX, Zhu YC. 2003. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intrarenal arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1370-1377.
- Lü L, Yao T, Zhu YZ, Huang GY, Cao YX, Zhu YC. 2003. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intrarenal arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1370-1377.
- Lucas PC, Forman BM, et al. 1991. Specificity of a retinoic acid response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter: consequences of both retinoic acid and thyroid hormone receptor binding. *Mol Cell Biol. Oct*; 11(10):5164-70.
- Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, Eriksson JW. 2007. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia* 50:625-633.
- Luo T, Sakai Y, Wagner E, Dräger UC. 2006. Retinoids, eye development, and maturation of visual function. *J Neurobiol* 66:677-686.
- MacDonald PN, Ong DE. 1988. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J Biol Chem* 263:12478-12482.
- MacLean G, Abu-Abed S, Dollé P, Tahayato A, Chambon P, Petkovich M. 2001. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* 107:195-201.
- Maden M, Ong DE, Summerbell D, Chytil F. 1988. Spatial distribution of cellular protein binding to retinoic acid in the chick limb bud. *Nature* 335:733-735.
- Maden M. 2006. Retinoids and spinal cord development. *J Neurobiol* 66:726-738.
- Mader, S. Chen, J. Y. Chen, Z. et al. 1993. The patterns of binding affinities of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 15:5029-5041.
- Makeover, A. Soprano, D. R. Wyatt, M. L. et al. 1989. Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and in perinephric fat tissue. *J Lipid Res* 30:171-180.
- Makino. S. Fujiwara, M. Suzukawa, K. et al. 2009. Visceral obesity is associated with the metabolic syndrome and elevated plasma retinol-binding protein-4 level in obstructive sleep apnea syndrome. *Horm Metab Res* 41:221-226.
- Makrakis J, Zimanyi M, Black M. 2007. Retinoic acid enhances nephron endowment in rats exposed to maternal protein restriction. *Pediatr Nephrol* 22:1861-1867.
- Mangelsdorf D, Kliewer S, Kakizuka A, Umesono K, Evans R. 1993. Retinoid receptors. *Recent Prog Horm Res* 48:99-121.

- Mangelsdorf D, Ong E, Dyck J, Evans R. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345:224-229.
- Mangelsdorf D. 1994. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52:S32-44.
- Manna A, Cadenotti L, Motto A, Ballo P. 2009. Reversible cardiac dysfunction without myocytolysis related to all-trans retinoic acid administration during induction therapy of acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 88:91-92.
- Manolescu DC, Jankowski M, Danalache BA, Wang D, Broderick TL, Chiasson JL, Gutkowska J. 2014. All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 39:1127-1136.
- Manolescu DC, Sima A, Bhat PV. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr* 140:311-316.
- Manolescu DC and Bhat PV. 2014. Vitamin-Binding Proteins; Serum Retinol-Binding Protein, Obesity and Insulin Resistance. CRC Press Taylor & Francis Group. 2:31-47.
- Marchitti S, Bocker C, Stagos D, Vasiliou V. 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:697-720.
- Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P, Cecconi F, Schwartz GJ, Singh R. 2016. Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metab* 23:113-127.
- Marwarha G, Berry DC, Croniger CM, Noy N. 2014. The retinol esterifying enzyme LRAT supports cell signaling by retinol-binding protein and its receptor STRA6. *FASEB J* 28:26-34.
- Masaki, T. Anan, F. Tsubone, T. et al. 2008. Retinol binding protein 4 concentrations are influenced by renal function in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 57:1340-1344.
- Mathews, K. A. Rhoten, W. B. Driscoll, H. K. et al. 2004. Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in rats. *J Nutr* 134:1958-1963.
- Matt N, Schmidt CK, Dupé V, Dennefeld C, Nau H, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. 2005. Contribution of cellular retinol-binding protein type 1 to retinol metabolism during mouse development. *Dev Dyn* 233:167-176.
- Matthews KA, Rhoten WB, Driscoll HK, Chertow BS. 2004. Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats. *J Nutr* 134:1958-1963.
- Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM, Association AD. 2003. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S78-79.
- Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, Boudina S, Abel ED. 2004. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* 53:2366-2374.
- McGrane MM. 2007. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. *J Nutr Biochem* 18:497-508.
- Meerza D, Iqbal S, Zaheer S, Naseem I. 2016. Retinoids have therapeutic action in type 2 diabetes. *Nutrition*. Jul-Aug;32(7-8):898-903.
- Mellati, A. A. Sharifi, F. Sajadinejad, M et al. 2012. The relationship between RBP4 levels, IR, androgen hormones and polycystic ovary syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 72:39-44.
- Melnick A, Licht JD. 1999. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93:3167-3215.
- Mercader J, Granados N, Bonet ML, Palou A. 2008. All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem* 22:363-372.
- Mercader J, Madsen L, Felipe F, Palou A, Kristiansen K, Bonet ML. 2007. All-trans retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 20:1061-1072.

- Mercader J, Palou A, Bonet M. 2010. Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity*, 18:655-662.
- Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML, Palou A. 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147:5325-5332.
- Metzger D, Imai T, Jiang M, et al. 2005. Functional role of RXRs and PPAR gamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:51-58.
- Metzger D, Imai T, Jiang M, Takukawa R, Desvergne B, Wahli W, Chambon P. 2005. Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:51-58.
- Mic F, Molotkov A, Fan X, Cuenca A, Duester G. 2000. RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev* 97:227-230.
- Mills JP, Furr HC, Tanumihardjo SA. 2008. Retinol to retinol-binding protein (RBP) is low in obese adults due to elevated apo-RBP. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:1255-1261.
- Mira-Y-Lopez R, Zheng WL, Kuppumbatti YS, Rexer B, Jing Y, Ong DE. 2000. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J Cell Physiol* 185:302-309.
- Mitsuishi M, Miyashita K, Itoh H. 2008. cGMP rescues mitochondrial dysfunction induced by glucose and insulin in myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 367:840-845.
- Miyashita K, et al. 2009. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes* 58:2880-2892.
- Mody, N. Graham, T. E. Tsuji, Y et al. 2008. Decreased clearance of serum RBP and elevated levels of transthyretin in insulin-resistant ob/ob mice. *Am J Physiol Metab* 294:E785-E793.
- Mohapatra, J. Sharma, M. Acharya, A. et al. 2011. Retinol-binding protein 4: a possible role in cardiovascular complications. *Br J Pharmacol* 164:1939-1948.
- Moise A, Noy N, Palczewski K, Blaner W. 2007. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 46:4449-4458.
- Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Association AD. 2003. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S94-98.
- Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW, Association AD. 2004. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 27 Suppl 1:S79-83.
- Molotkov A, Deltour L, Foglio M, Cuenca A, Duester G. 2002a. Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J Biol Chem* 277:13804-13811.
- Molotkov A, Duester G. 2003. Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase *Raldh1* (*Aldh1a1*) functions downstream of alcohol dehydrogenase *Adh1* in metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem* 278:36085-36090.
- Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio M, Martras S, Farrés J, Parés X, Duester G. 2002b. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5337-5342.
- Molotkov A, Molotkova N, Duester G. 2005. RA generated by *Raldh2* in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn*. Apr;232 (4):950-7.
- Monaco HL, Rizzi M, Coda A. 1995. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* 268:1039-1041.
- MOORE T. 1959. Vitamin A. *Practitioner* 182:5-14.
- Mootha VK, et al. 2003. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273.

Morino K, et al. 2005. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115:3587-3593.

Morino K, et al. 2008. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 57:2644-2651.

Morino K, Petersen KF, Shulman GI. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2:S9-S15.

Moro C, Crampes F, Sengenès C, De Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M. 2004. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J* 18:908-910.

Moro C, Lafontan M. 2013. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H358-368.

Moro C. 2013. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.

Mostafaie, N. Sebesta, C. Zehetmayer, S. et al. 2011. Circulating retinol-binding protein 4 and metabolic syndrome in the elderly. *Wien Med Wochenschr* 161:505-510.

Motani A, Zhulun, W. Conn, M. et al. 2009. Identification and characterization of a non-retinoid ligand for retinol-binding protein 4 which lowers serum retinol-binding protein 4 levels in vivo. *J Biol Chem* 284:7673-7680.

Muenzner M, Tuvia N, Deutschmann C, Witte N, Tolkachov A, Valai A, Henze A, Sander LE, Raila J, Schupp M. 2013. Retinol-binding protein 4 and its membrane receptor STRA6 control adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis and retinoic acid receptor α activity. *Mol Cell Biol* 33:4068-4082.

Mukherjee, R. Davies, P. J. Crombie, D. L. et al. 1997. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonist. *Nature* 386:407-294.

Munkhtulga, L. Nagashima, S. Nakayama, K. et al. 2010. Regulatory SNP in the RBP4 gene modified the expression in adipocytes and associated with BMI. *Obesity* 18:1006-1014.

Myhre AM, Takahashi N, Blomhoff R, Breitman TR, Norum KR. 1996. Retinoylation of proteins in rat liver, kidney, and lung in vivo. *J Lipid Res* 37:1971-1977.

Nagao A. 2004. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 134:237S-240S.

Nakamura N et al. 2017. Factors Associated with Microalbuminuria Remission in Patients with Type 2 Diabetes: Importance of Early Intervention for Microalbuminuric Patients (TSUGARU STUDY). *DIABETIC NEPHROPATHY GROUP. In Vivo*. 2017 May-Jun;31(3):285-290.

Napoli J, Posch K, Fiorella P, Boerman M. 1991. Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of cellular retinol-binding protein (CRBP) and cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis. *Biomed Pharmacother* 45:131-143.

Napoli J. 1996a. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80:S52-62.

Napoli J. 1996b. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* 10:993-1001.

Napoli J. 1999. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63:139-188.

Napoli J. 2000. A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr Rev* 58:230-236.

Napoli JL. 2000. Retinoic acid: biosynthesis & metabolism. *Prog Nucl Acid Res* 63:139-188.

Napoli JL. 2012. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1821:152-167.

- Napoli JL. 2016. Functions of Retinoid Binding-Proteins. *Subcell Biochem.* 2016;81:21-76.
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier J, Chambon P, Dollé P. 2002a. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* 110:165-171.
- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21:444-448.
- Niederreither K, Vermot J, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. 2002b. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)- independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16111-16116.
- Niederreither K, Vermot J, Le Roux I, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. 2003. The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* 130:2525-2534.
- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. 2001. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 128:1019-1031.
- Niles R. 2004. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 555:81-96.
- Norseen J, et al. 2012. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 32:2010-2019.
- Noy N. 2000. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 348 Pt 3:481-495.
- Noy N. 2015 Signaling by retinol and its serum binding protein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015 Feb;93:3-7.
- Noy N. 2016. Vitamin A Transport and Cell Signaling by the Retinol-Binding Protein Receptor STRA6. *Subcell Biochem.* 2016;81:77-93.
- Oberbach, A. Bluher, M. Wirth, H. et al. 2011. Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *J Proteome Res* 10:4769-4788.
- O'Byrne S, Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg I, Baehr W, Palczewski K, Blaner W. 2005. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem* 280:35647-35657.
- O'Byrne SM, Blaner WS. 2013. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res* 54:1731-1743.
- Ong D, Newcomer M, Lareyre J, Orgebin-Crist M. 2000. Epididymal retinoic acid-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1482:209-217.
- Ong D. 1994. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52:S24-31.
- Orland M, Anwar K, Cromley D, Chu C, Chen L, Billheimer J, Hussain M, Cheng D. 2005. Acyl coenzyme A dependent retinol esterification by acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta* 1737:76-82.
- Ortega-Senovilla, H. Schaefer-Graf, U. Meitzner, K. et al. 2011. Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipokines in cord blood. *Diabetes Care* 34:2061-2066.
- Ost A, Danielsson A, Lidén M, Eriksson U, Nystrom FH, Strålfors P. 2007. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *FASEB J* 21:3696-3704.

- Ou, H. Y. Wu, H. T. Yang, Y. C. et al. 2011. Elevated retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Horm Metab Res* 43:312-318.
- Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira MM, Blaner W. 2004. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr* 134:276S-280S.
- Paiva SA, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, Zornoff LA. 2005. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr* 135:2326-2328.
- Pala, A. Monami, M. Ciani, S. et al. 2012. Adipokines as possible new predictors of cardiovascular diseases: a case control study. *Journal of Nutrition and Metabolism*.
- Palace VP, Hill MF, Khaper N, Singal PK. 1999. Metabolism of vitamin A in the heart increases after a myocardial infarction. *Free Radic Biol Med* 26:1501-1507.
- Pan J, Baker KM. 2007. Retinoic acid and the heart. *Vitam Horm* 75:257-283.
- Parés X, Farrés J, Kedishvili N, Duester G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65:3936-3949.
- Park H, Green MH, Shaffer ML. 2012. Association between serum retinol-binding protein 4 concentrations and clinical indices in subjects with type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Nutr Diet* 25:300-310.
- Park, C. S. Ihm, S. H. Park, H. J. et al. 2011. Relationship between plasma adiponectin, RBP4 and uric acid in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Korean Circ J* 41:198-202.
- Parker RO, Crouch RK. 2010. Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp Eye Res* 91:788-792.
- Pasutto F, Sticht, H. Hammersen, G. et al. 2007. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 80:550-560.
- Patti ME, et al. 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466-8471.
- Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, Lopez-Miranda J, Vazquez-Martínez R, Malagón MM. 2010. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* 10:3356-3366.
- Penzes P, Wang X, Napoli J. 1997a. Enzymatic characteristics of retinal dehydrogenase type I expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1342:175-181.
- Penzes P, Wang X, Sperkova Z, Napoli J. 1997b. Cloning of a rat cDNA encoding retinal dehydrogenase isozyme type I and its expression in *E. coli*. *Gene* 191:167-172.
- Persson B, et al. 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact* 178:94-98.
- Petersen KF, Shulman GI. 2006. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119:S10-16.
- Peterson P, Rask L. 1971. Studies on the fluorescence of the human vitamin A-transporting plasma protein complex and its individual components. *J Biol Chem* 246:7544-7550.
- Peterson, P. A. 1971. Characterization of a vitamin A transport protein complex occurring in human serum. *J Biol Chem* 246:34-43.
- Petkovich M, Brand N, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.

- Petkovich M. 1992. Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr* 12:443-471.
- Petkovich P. 2001. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45:S136-142.
- Piantedosi R, Ghyselinck N, Blaner W, Vogel S. 2005. Cellular retinol-binding protein type III is needed for retinoid incorporation into milk. *J Biol Chem* 280:24286-24292.
- Pingitore A, Cione E, Senatore V, Genchi G. 2009. Adrenal glands and testes as steroidogenic tissue are affected by retinoylation reaction. *J Bioenerg Biomembr* 41:215-221.
- Plante E, Menaouar A, Danalache BA, Broderick TL, Jankowski M, Gutkowska J. 2014. Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice. *Diabetologia* 57:1257-1267.
- Plet A, Gerbaud P. et al. 1988. Effect of phorbol ester on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in PYS teratocarcinoma-derived cells and counteraction with retinoic acid. *Cancer Res*. Jul 15; 48(14):3993-7.
- Pocai A, Obici S, Schwartz GJ, Rossetti L. 2005. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 1:53-61.
- Preitner F, Mody N, Graham TE, Peroni OD, Kahn BB. 2009. Long-term Fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1420-1429.
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3:S405-413.
- Prentki M, Nolan CJ. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116:1802-1812.
- Prentki M. 1996. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134:272-286.
- Promintzer, M. Krebs, M. Todoric, J. et al. 2007. Insulin resistance is unrelated to circulating retinol binding protein and protein C inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4306-4312.
- Puigserver P, Vázquez F, Bonet ML, Picó C, Palou A. 1996. In vitro and in vivo induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem. J.* 317: 827-833.
- Qatanani M, Lazar MA. 2007. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21:1443-1455.
- Quadro L, Blaner W, Hamberger L, Novikoff P, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Colantuoni V. 2004. The role of extrahepatic retinol binding protein in the mobilization of retinoid stores. *J Lipid Res* 45:1975-1982.
- Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME. 1999. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J* 18:4633-4644.
- Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, Gottesman M, Blaner W. 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med* 24:421-430.
- Quadro, L. Blaner, W. S. Hamberger, L. et al. 2002. Muscle expression of human retinol-binding protein (RBP). Suppression of the visual defect of RBP knockout mice. *J Biol Chem* 277:30191-30197.
- Quadro, L. Blaner, W. S. Hamberger, L. et al. 2004. The role of extrahepatic retinol binding protein in the mobilization of retinoid stores. *J Lipid Res* 45:1975-1982.
- Rabega M et Rabega C. 1983. Vitamine, enzyme si hormoni. Editura Albatros, Roumanie.
- Raghunathan L, Hsu L, Klisak I, Sparkes R, Yoshida A, Mohandas T. 1988. Regional localization of the human genes for aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase-2. *Genomics* 2:267-269.

- Raila, J. Henze, A. Spranger, J et al. 2007. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Intl* 72:505-511.
- Rajala MW, Scherer PE. 2003. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773.
- Rajan N, Kidd G, Talmage D, Blaner W, Suhara A, Goodman D. 1991. Cellular retinoic acid-binding protein messenger RNA: levels in rat tissues and localization in rat testis. *J Lipid Res* 32:1195-1204.
- Rajawat Y, Hilioti Z, Bossis I. 2010. Autophagy: a target for retinoic acids. *Autophagy* 6:1224-1226.
- Rastinejad F, Wagner T, Zhao Q, Khorasanizadeh S. 2000. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J* 19:1045-1054.
- Rastinejad F. 2001. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11:33-38.
- Ray W, Bain G, Yao M, Gottlieb D. 1997. CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem* 272:18702-18708.
- Redmond TM, Gentleman S, Duncan T, Yu S, Wiggert B, Gantt E, Cunningham FX. 2001. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem* 276:6560-6565.
- Reichert B, Yasmeen, R. Jeyakumar, S. M. et al. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol Endocrinol* 25:799-809.
- Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M. 2005. The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285:224-237.
- Reijntjes S, Gale E, Maden M. 2004. Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn* 230:509-517.
- Reinehr, T. Stoffel-Wagner, B. and Roth, C. L. 2008. RBP4 and relation to insulin resistance in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2287-2293.
- Rexer B, Zheng W, Ong D. 2001. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 61:7065-7070.
- Rhee EJ, Plutzky J. 2012. Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 36:167-180.
- Rhie, Y. J. Choi, B. M. Eun, S. H. et al. 2011. Association of serum RBP4 with adiposity and pubertal development in Korean children and adolescents. *J Korean Med Sci* 26:797-802.
- Ribel-Madsen, R. Friedrichsen, M. Vaag, A. et al. 2009. Retinol-binding protein 4 in twins. Regulatory mechanisms and impact of circulating and tissue expression levels on insulin secretion and action. *Diabetes* 58:54-60.
- Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A. 2001. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res* 9:500-509.
- Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, Laville M, Vidal H. 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2232-2241.
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. 2005. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:8-14.
- Roberts JL, Ashwell M, Enser M. 1986. Brown adipose tissue triacylglycerol fatty acids of obese and lean mice: in situ and in transplants. *Lipids*. Mar; 21 (3):195-201.
- Rolf D. Schmid 2005. *Biotechnologie et Génie génétique*, Ed. Flammarion, France, UE.
- Romand R. 2003. The roles of retinoic acid during inner ear development. *Curr Top Dev Biol* 57:261-291.

- Rosen ED, MacDougald OA. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896.
- Rosen ED, Spiegelman BM. 2001. PPAR-gamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276:37731-37734.
- Ross A, Zolfaghari R, Weisz J. 2001. Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol* 17:184-192.
- Ross A, Zolfaghari R. 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr* 134:269S-275S.
- Ross A. 1993a. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J* 7:317-327.
- Ross A. 1993b. Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* 123:346-350.
- Ross S, McCaffery P, Drager U, De Luca L. 2000a. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80:1021-1054.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. 2000b. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80:1021-1054.
- Rouru J, Cusin I, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. 1999. Effects of intravenously infused leptin on insulin sensitivity and on the expression of uncoupling proteins in brown adipose tissue. *Endocrinology*. Aug; 140(8):3688-92.
- Ruff S, Ong D. 2000. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria. *FEBS Lett* 487:282-286.
- Rysa J, Tenhunen O, Serpi R, Soini Y, Nemer M, Leskinen H, Ruskoaho H. 2010. GATA-4 is an angiogenic survival factor of the infarcted heart. *Circ Heart Fail* 3:440-450.
- Rysä J, Tenhunen O, Serpi R, Soini Y, Nemer M, Leskinen H, Ruskoaho H. 2010. GATA-4 is an angiogenic survival factor of the infarcted heart. *Circ Heart Fail* 3:440-450.
- Saely CH, Geiger K, Drexel H. 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58:15-23.
- Safonova I, Darimont C, Amri EZ, Grimaldi P, Ailhaud G, Reichert U, Shroot B. 1994a. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 104:201-211.
- Safonova I, Reichert U, Shroot B, Ailhaud G, Grimaldi P. 1994b. Fatty acids and retinoids act synergistically on adipose cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 204:498-504.
- Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. 2001. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15:213-225.
- Salgado-Somoza, A. Teijeira-Fernandez, E. Rubio, J. et al. 2012. Coronary artery disease is associated with higher epicardial RBP4 and lower glucose transporter (GLUT)4 levels in epicardial and subcutaneous adipose tissue. *Clin Endocrinol* 76:51-58.
- Saltiel AR. 2000. Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest* 106:163-164.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Diabetes-Obesity* 18:884-889.
- Santoro, N. Perrone, L. Cirillo, G. et al. 2009. Variations of RBP4 levels are not associated with changes in insulin resistance during puberty. *J Endocrinol Invest* 32:411-414.
- Sasaki, M. Otani, T. Kawakami, M. et al. 2010. Elevation of plasma RBP4 and reduction of plasma adiponectin in subjects with cerebral infarction. *Metabolism* 59:527-532.

- Saucedo, R. Zarate, A. Basurto, L. et al. 2011. Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. *Arch Med Res* 42:318-323.
- Scarpioni, L. Dall'aglio, P. P. Poietti, P. G. et al. 1976. Retinol binding protein in serum and urine of glomerular and tubular nephropathies. *Clin Chim Acta* 68:107-113.
- Schmieder RE, Messerli FH. 1987. Obesity hypertension. *Med Clin North Am* 71:991-1001.
- Schupp M, et al. 2009. Retinol saturase promotes adipogenesis and is downregulated in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1105-1110.
- Scribner K, Odom D, McGrane M. 2007. Nuclear receptor binding to the retinoic acid response elements of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in vivo: effects of vitamin A deficiency. *J Nutr Biochem* 18:206-214.
- Seeliger M, Biesalski H, Wissinger B, Gollnick H, Gielen S, Frank J, Beck S, Zrenner E. 1999. Phenotype in retinol deficiency due to a hereditary defect in retinol binding protein synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:3-11.
- Sengenès C, Moro C, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. 2005. [Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human fat cells]. *Med. Science*, 21: 29-33.
- Senoo H, Imai K, Mezaki Y, Miura M, Morii M, Fujiwara M, Blomhoff R. 2012. Accumulation of vitamin A in the hepatic stellate cell of arctic top predators. *Anat Rec (Hoboken)* 295:1660-1668.
- Serino M, Fernández-Real JM, García-Fuentes E, Fuentes EG, Queipo-Ortuño M, Moreno-Navarrete JM, Sánchez A, Burcelin R, Tinahones F. 2013. The gut microbiota profile is associated with insulin action in humans. *Acta Diabetol* 50:753-761.
- Serino M, Luche E, Chabo C, Amar J, Burcelin R. 2009. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes Metab* 35:262-272.
- Serpil Gumustekin, Talat Senel, Mehmet Ali Cengiz 2014. A Comparative Study on Bayesian Optimization Algorithm for Nutrition Problem. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(12):952-958.
- Shao D, Lazar MA. 1997. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 272:21473-21478.
- Shaw N, Elholm M, Noy N. 2003 Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*. 24; 278(43):41589-92
- Shehab-Elden, W. Shueb, S. Khamis, S. et al. 2009. Susceptibility to insulin resistance after kidney donation: a pilot observational study. *Am J Nephrol* 30:371-376.
- Shepherd, P. R. and Khan, B. B. 1999. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetic mellitus. *N Engl J Med* 341:248-257.
- Shimamura M, Karasawa H, Sakakibara S, Shinagawa A. 2010. Raldh3 expression in diabetic islets reciprocally regulates secretion of insulin and glucagon from pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 401:79-84.
- Shirakami Y, Lee SA, Clugston RD, Blaner WS. 2012. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim Biophys Acta* 1821:124-136.
- Shmarakov IO, Jiang H, Yang KJ, Goldberg IJ, Blaner WS. 2013. Hepatic retinoid stores are required for normal liver regeneration. *J Lipid Res* 54:893-908.
- Shulman A, Mangelsdorf D. 2005. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 353:604-615.
- Silha, J. V. Gregoire-Nyomba, B. L. Leslie, W. D. 2007. Ethnicity, IR, and inflammatory adipokines in women at high and low risk for vascular disease. *Diabetes Care* 30:286-291.
- Sima A, Manolescu DC, Bhat PV. 2011. Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues. *Biochem Cell Biol* 89:578-584.

- Sima A, Parisotto M, Mader S, Bhat PV. 2009. Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* 1790:1660-1664.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458:1131-1135.
- Skop V, Cahová M, Papáčková Z, Páleníčková E, Daňková H, Baranowski M, Zabielski P, Zdychová J, Zídková J, Kazdová L. 2012. Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver. *Physiol Res* 61:287-297.
- Somwar R, Kim DY, Sweeney G, Huang C, Niu W, Lador C, Ramlal T, Klip A. 2001a. GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 359:639-649.
- Somwar R, Koterski S, Sweeney G, Sciotti R, Djuric S, Berg C, Trevillyan J, Scherer PE, Rondinone CM, Klip A. 2002. A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 277:50386-50395.
- Somwar R, Niu W, Kim DY, Sweeney G, Randhawa VK, Huang C, Ramlal T, Klip A. 2001b. Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating GLUT4 translocation and glucose transport. *J Biol Chem* 276:46079-46087.
- Sonoda J, Pei L, Evans R. 2008. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 582:2-9.
- Sopher. A. B. Gerken, A. T. Blaner W. S. et al. 2012. Metabolic manifestations of polycystic ovary syndrome in nonobese adolescents: retinol-binding protein 4 and ectopic fat deposition. *Fertil Steril* 97:1009-1015.
- Sophos N, Vasiliou V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* 143-144:5-22.
- Soprano D, Qin P, Soprano K. 2004. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24:201-221.
- Soprano, D. R. and Blaner, W. S. 1994. Plasma retinol-binding protein. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, M. B. Sporn, A. B. Roberts and D. S. Goodman, 257- 282.
- Sporn M, Roberts A, Roche N, Kagechika H, Shudo K. 1986. Mechanism of action of retinoids. *J Am Acad Dermatol* 15:756-764.
- Stachurska E, Loboda A, Niderla-Bielińska J, Szperl M, Juszyński M, Jozkowicz A, Dulak J, Ratajska A. 2011. Expression of cellular retinoic acid-binding protein I and II (CRABP I and II) in embryonic mouse hearts treated with retinoic acid. *Acta Biochim Pol* 58:19-29.
- Stafford D1, Hornbruch A. et al. 2004. A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Dev Genes Evol. Sep*; 214 (9):432-41
- Stefan N. Hennige, A. M. Staiger, H. 2007. High circulating retinol-binding protein 4 is associated with elevated liver fat but not with total, subcutaneous, visceral, or intramyocellular fat in humans. *Diabetes Care* 30:1173-1178.
- Stephensen C. 2001. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 21:167-192.
- Stienstra R, Haim Y, Riahi Y, Netea M, Rudich A, Leibowitz G. 2014. Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes. *Diabetologia* 57:1505-1516.
- Stuck BJ. and Kahn, B. B. 2009. Retinol binding protein 4 (RBP4): a biomarker for subclinical atherosclerosis. *Am J Hypertens* 22:948-949.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346.
- Su Y. X. Hong, J. Yan, Q. et al. 2010. Increased serum retinol-binding protein-4 levels in pregnant women with and without gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 36:470-475.

- Suh J. B. Kim, S. M. Cho, G. J. et al. 2010. Elevated serum retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance in older women. *Metabolism* 59:118-122.
- Sun H, Kawaguchi R. 2011. The membrane receptor for plasma retinol-binding protein, a new type of cell-surface receptor. *Int Rev Cell Mol Biol* 288:1-41.
- Sundaresan PR. 1977. Rate of metabolism of retinol and retinoic acid-maintained rats after a single dose of radioactive retinol. *J Nutr* 107:70-78.
- Swerdloff RS, Batt RA, Bray GA. 1976. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*. Jun; 98 (6):1359-64.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray I, Davies P, Nagy L. 2004. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho) physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2:S126-143.
- Szeto A, Nation DA, Mendez AJ, Dominguez-Bendala J, Brooks LG, Schneiderman N, McCabe PM. 2008. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1495-1501.
- Szeto W, et al. 2001. Overexpression of the retinoic acid-responsive gene *Stra6* in human cancers and its synergistic induction by Wnt-1 and retinoic acid. *Cancer Res* 61:4197-4205.
- Tahayato A, Dollé P, Petkovich M. 2003. *Cyp26C1* encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. *Gene Expr Patterns* 3:449-454.
- Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M. 2004. A novel human cytochrome P450, *CYP26C1*, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 279:77-85.
- Takase S, Ong D, Chytil F. 1986. Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. *Arch Biochem Biophys* 247:328-334.
- Tallman M, et al. 2002. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* 100:4298-4302.
- Tamori Y, Sakaue H, Kasuga M. 2006. RBP4, an unexpected adipokine. *Nat Med* 12:30-31; discussion 31.
- Tamura N, et al. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4239-4244.
- Tan, Y. Sun, L. Q. Kamal, M. A. et al. 2011. Suppression of retinol-binding protein 4 with RNA oligonucleotide prevents high-fat diet-induced metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Biochim Biophys Acta* 1811:1045-1053.
- Tavridou A, Unwin NC, Laker MF, White M, Alberti KG. 1997. Serum concentrations of vitamins A and E in impaired glucose tolerance. *Clin Chim Acta* 266:129-140.
- Tchkonia T, et al. 2006. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 55:2571-2578.
- Tchkonia T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, Kirkland JL. 2013. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metab* 17:644-656.
- Teruel T, Hernandez R et al. 2003. Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem*. Jan 3; 278 (1):263-9.
- Thielitz A, Abdel-Naser M, Fluhr J, Zouboulis C, Gollnick H. 2008. Topical retinoids in acne--an evidence-based overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 6:1023-1031.
- Thompson JN, Howell JM, Pitt GA. 1964. Vitamin A and reproduction in rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159:510-535.

- Tomaszewski, M. Charchar, F. J. Maric, C. et al. 2007. Glomerular hyperfiltration: a new marker of metabolic risk. *Kidney Int* 71:816-821.
- Tönjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, Stumvoll M, Blüher M. 2010. Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes.
- Townsend KL, Tseng YH. 2014 Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* Apr;25 (4):168-77.
- Trasino SE, Benoit YD, Gudas LJ. 2015. Vitamin A deficiency causes hyperglycemia and loss of pancreatic β -cell mass. *J Biol Chem* 290:1456-1473.
- Trasino SE, Tang XH, Jessurun J2, Gudas LJ. 2015. Obesity Leads to Tissue, but not Serum Vitamin A Deficiency. *Sci Rep.* Nov 2; 5: 15893
- Trivedi P, Yang R, Barouch LA. 2008. Decreased p110 α catalytic activity accompanies increased myocyte apoptosis and cardiac hypertrophy in leptin deficient ob/ob mice. *Cell Cycle* 7:560-565.
- Trumbo P, Yates A, Schlicker S, Poos M. 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101:294-301.
- Tsukamoto O, et al. 2009. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 53:2070-2077.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 267:1805-1810.
- Tuitoek PJ, Lakey JR, Rajotte RV, Basu TK. 1996. Strain variation in vitamin A (retinol) status of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res* 66:101-105.
- Uchida S, Fuke S, Tsukahara T. 2007. Upregulations of Gata4 and oxytocin receptor are important in cardiomyocyte differentiation processes of P19CL6 cells. *J Cell Biochem* 100:629-641.
- Ulgen, F. Herder, C. Kuhn, M. C. et al. 2010. Association of serum levels of RBP4 with male sex but not with insulin resistance in obese patients. *Arch Physiol Biochem* 116:57-62.
- Urbach J, Rando R. 1994. Thiol dependent isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. *FEBS Lett* 351:429-432.
- Uruno A, Sugawara A, Kanatsuka H, Kagechika H, Saito A, Sato K, Kudo M, Takeuchi K, Ito S. 2005. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* 112(5):727-736.
- van Bennekum A, Fisher E, Blaner W, Harrison E. 2000. Hydrolysis of retinyl esters by pancreatic triglyceride lipase. *Biochemistry* 39:4900-4906.
- Van den Bergh A, et al. 2008. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc Res* 77:371-379.
- van Hoek, M. Dehghan, A. Zillikens, M. C. et al. 2008. An RBP4 promoter polymorphism increases risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 51:1423-1428.
- Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360:1500-1508.
- Vasiliou V, Nebert D. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2:138-143.
- Villamor E, Fawzi W. 2005. Effects of vitamin a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin Microbiol Rev* 18:446-464.
- Villarroya F, Giralt M, Iglesias R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1-6.

- Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. 2004. Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem* 11:795-805.
- Villarroya F. 1998. Differential effects of retinoic acid on white and brown adipose tissues. An unexpected role for vitamin A derivatives on energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 839:190-195.
- Villarroya, F. Giralt, M. and Iglesias, R. 1999. Retinoids and adipose tissue: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1-6.
- Vitkova, M. Klimcakova, E. Kovacikova, M. et al. 2007. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2330-2335.
- Vogel S, Mendelsohn C, Mertz J, Piantedosi R, Waldburger C, Gottesman M, Blaner W. 2001. Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol. *J Biol Chem* 276:1353-1360.
- Vogel, S. Piantedosi, R. O'Bryne, S. M. et al. 2002. Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry* 41:15360-15368.
- von Eynatten, M. Lepper, P. M. Liu, D. et al. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with components of metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary heart disease. *Diabetologia* 50:1930-1937.
- Wako Y, Suzuki K, Goto Y, Kimura S. 1986. Vitamin A transport in plasma of diabetic patients. *Tohoku J Exp Med* 149:133-143.
- Wang HJ, Zhu YC, Yao T. 2002. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy. *J Appl Physiol* 92:2162-2168.
- Wang X, Krinsky N. 1997. Identification and quantification of retinoic acid and other metabolites from beta-carotene excentric cleavage in human intestine in vitro and ferret intestine in vivo. *Methods Enzymol* 282:117-130.
- Wang Z., Niederreither K. et al. 2006. Retinoic acid regulates morphogenesis & patterning of posterior foregut derivatives. *Dev Biol. Sep 15;297 (2):433-45*
- Warner JE, Larson AJ, Bhosale P, Digre KB, Henley C, Alder SC, Katz BJ, Bernstein PS. 2007. Retinol-binding protein and retinol analysis in cerebrospinal fluid and serum of patients with and without idiopathic intracranial hypertension. *J Neuroophthalmol* 27:258-262.
- Warrell RP, Frankel SR, Miller WH, Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A. 1991. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 324:1385-1393.
- Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman M, Blaner W. 1995. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J Biol Chem* 270:866-870.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808.
- White J, Beckett B, Scherer S, Herbrick J, Petkovich M. 1998. P450RAI (CYP26A1) maps to human chromosome 10q23-q24 and mouse chromosome 19C2-3. *Genomics* 48:270-272.
- White J, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam S, Jones G, Petkovich M. 2000. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6403-6408.
- Whittle AJ, Vidal-Puig A. 2012. NPs -- heart hormones that regulate brown fat? *J Clin Invest* 122:804-807.

- Wijers SL, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD. 2009. Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity. *Obes Rev* 10:218-226.
- Wolf G. 2001. The discovery of the visual function of vitamin A. *J Nutr* 131:1647-1650.
- Wongsiriroj N, Piantedosi R, Palczewski K, Goldberg I, Johnston T, Li E, Blaner W. 2008. The molecular basis of retinoid absorption: a genetic dissection. *J Biol Chem* 283:13510-13519.
- Wu BX, Chen Y, Fan J, Rohrer B, Crouch RK, Ma JX. 2002. Cloning and characterization of a novel all-trans retinol short-chain dehydrogenase/reductase from the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3365-3372.
- Wu J, et al. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366-376.
- Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG. 1996. 1, 25(OH)₂ vitamin D₃, and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 97:1577-1588.
- Wu J, Xiang H, Qi Y, Yang D, Wang X, Sun H, Wang F, Liu B. 2014. Adaptive evolution of the STRA6 genes in mammalian.
- Wu, H. Wei, L. Bao, Y. et al. 2009. Fenofibrate reduces serum retinol-binding protein-4 by suppressing its expression in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E628-E634.
- Xu, M. Li, X. Y. Wang, J. G. et al. 2009. Retinol binding protein 4 is associated with impaired glucose regulation and microalbuminuria in a Chinese population. *Diabetologia* 52:1511-1519.
- Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA. 1996. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol* 16:1567-1575.
- Yagmur, E. Weiskirchen, R. Gressner, A. M. et al. 2007. Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care* 30:1168-1172.
- Yamaji M, Tsutamoto T, Tanaka T, Kawahara C, Nishiyama K, Yamamoto T, Fujii M, Horie M. 2009. Effect of carperitide on plasma adiponectin levels in acute decompensated heart failure patients with diabetes mellitus. *Circ J* 73:2264-2269.
- Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross A. 2000. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. *FASEB J* 14:2119-2127.
- Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni O, Zabolotny J, Kotani K, Quadro L, Kahn B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362.
- Yao-Borengasser, A. Varma, V. Bodles, A. M. et al. 2007. Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2590-2597.
- Yeste, D. Vendrell, J. Tomasini, R. et al. 2010. Retinol-binding protein 4 levels in obese children and adolescents with glucose intolerance. *Horm Res Pediat* 73:335-340.
- Yoshizaki T, et al. 2012. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 417:352-357.
- Zang, X. K. Lehman, J. Hoffmann, B. et al. 1992. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 358:587-591.
- Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht J. 2001. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20:7186-7203.
- Zemany L, Kraus BJ, Norseen J, Saito T, Peroni OD, Johnson RL, Kahn BB. 2014. Downregulation of STRA6 in adipocytes and adipose stromovascular fraction in obesity and effects of adipocyte-specific STRA6 knockdown in vivo. *Mol Cell Biol* 34:1170-1186.

- Zhai Y, Sperkova Z, Napoli J. 2001. Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. *J Cell Physiol* 186:220-232.
- Zhang G, Cai D. 2011. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E1004-1012.
- Zhang M, Hu P, Krois C, Kane M, Napoli J. 2007. Altered vitamin A homeostasis and increased size and adiposity in the rdh1-null mouse. *FASEB J* 21:2886-2896.
- Zhang X, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson M, Cameron J, Graupner G, Hermann T, Tran P, Pfahl M. 1992. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 358:587-591.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhao D, McCaffery P, Ivins K, Neve R, Hogan P, Chin W, Dräger U. 1996. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem* 240:15-22.
- Zheng W, Ong D. 1998. Spatial and temporal patterns of expression of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding proteins in rat uterus during early pregnancy. *Biol Reprod* 58:963-970.
- Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. 1995. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7391-7395.
- Zhuang R, Lin M, Napoli J. 2002. cis-Retinol/androgen dehydrogenase, isozyme 3 (CRAD3): a short-chain dehydrogenase active in a reconstituted path of 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *Biochemistry* 41:3477-3483.
- Ziouzenkova O, et al. 2007a. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13:695-702.
- Ziouzenkova O, et al. 2007b. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13:695-702.
- Ziouzenkova O, Orasanu G, Sukhova G, Lau E, Berger J, Tang G, Krinsky N, Dolnikowski G, Plutzky J. 2007c. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol Endocrinol* 21:77-88.
- Ziouzenkova O, Plutzky J. 2008. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett* 582:32-38.
- Zizola CF, Frey SK, Jitngarmkusol S, Kadereit B, Yan N, Vogel S. 2010. Cellular retinol-binding protein type I (CRBP-I) regulates adipogenesis. *Mol Cell Biol* 30:3412-3420.
- Zizola CF, Schwartz GJ, Vogel S. 2008. Cellular retinol-binding protein type III is a PPARgamma target gene and plays a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1358-1368.

Annexes

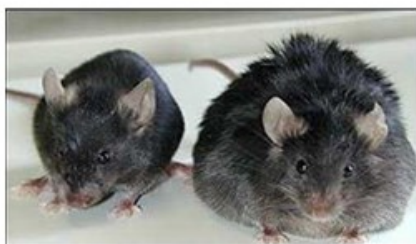
Annexes 1. Introduction, impacts, architecture, expertises et perspectives du projet

Annexes 2. Publications in folio du projet, attestations et reglementations

Annexes 3. Excellence, scolarité, recommandations et notes biographiques

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Impacts métaboliques et thérapeutiques de la vitamine A, sous forme d'acide rétinolique, dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 chez la souris ob/ob



par **Daniel Constantin Manolescu PhD.Cdt.Nutrition**
BSc.(ing.) Sciences Tech Alimentaires, MSc.Nutrition/Médecine

Faculté de Médecine, Département de Nutrition, Université de Montréal

* « FIDE SPLENDET ET SCIENTIA » *

Manolescu DC PhD Cdt Nutrition/Médecine UdeM 2018

Crédit photo Medscape Education at medscape.org

Thèse acceptée le 30. Nov. 2018

Notes d'excellence du projet de recherche et du candidat

Institut de Recherche en Santé Canada / Canadian Health Research Institut (IRSC/CIHR)

- Médaille d'Argent Nationale de Recherche IRSC /CHRSF 2012 (first 2%)
- 2 bourses PhD IRSC (Banting et Best 2014 - first 3% et Formation 2013/ 1-er rang).

Fonds de Recherche en Québec Santé (FRQS)

- Bourse PhD FRQS/ 1-er rang (2012, 2013)

Université de Montréal, FESP, Centres de Recherche CRCHUM et CMDO Québec, Canada

- 02.2015 - Sélectionné meilleurs 9 étudiants PhD du Québec en Diabète, Obésité (FRQS/CMDO)
- 3 Bourses PhD CRCHUM (2 Rang/13 cdt-2015, 2 Rang/33 cdt-2012, 1st Rang/45 cdt - 2011)
- J.A. de Sève PhD 2012, excellence PhD 2013-FESP,

Gouvernement du Canada

- Médaille de Diamant de H.M. Queen Elizabeth II/ 2013.

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

NUTRI-CAUSERIE LUNCH AND LEARN SERIES

(BILINGUAL PRESENTATION)

Retinoids in obesity and diabetes - From mouse to human



Presenter :

Daniel Constantin Manolescu,
M.Sc., Cdt. PhD

Département de nutrition
Faculté de médecine

Université de Montréal et CRCHUM-Hôtel Dieu,

Dr. Manolescu a reçu plus d'une trentaine de prix dont la Médaille d'Argent de recherche scientifique canadienne CHRSF des Instituts IRSC. En 2013 il a reçu la Médaille du jubilé du diamant de Sa Majesté la Reine Elizabeth II. Son allocution portera sur l'implication des rétinoïdes (vitamine A, acide rétinoïque) dans l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2.

Dr. Manolescu has received more than 30 awards of excellence including the CIHR/CHRSF Silver Medal for Canadian scientific research. In 2013, he received the Queen Elizabeth II Diamond Jubilee Medal. His talk will present his research on the role of retinoids (e.g. vitamin A, retinoic acid) in obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes.

Présentée par:



uOttawa

Faculté des sciences de la santé
Faculty of Health Sciences

Programme en sciences
de la nutrition

Program in Nutrition Sciences

THURSDAY, MAY 14, 2015
12 p.m. to 1 p.m.

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu



CRCHUM

EXCELLENCE ■ INNOVATION ■ VALORISATION

[Accueil](#) > [Centre de recherche du CHUM \(CRCHUM\)](#) > [Communiqués](#) > 28 février 2013

A+ | A- |

Communiqués

- Le CRCHUM en bref
- Accueil
- Axes de recherche
- Chercheurs
- Recherche clinique
- Éthique de la recherche
- Études supérieures et postdoctorales
- Plateformes et services
- Offres d'emplois
- Ressources internes
- Bulletin Recherche CRCHUM
- Calendrier des activités scientifiques
- Le Grand Labo du CRCHUM 2012
- Défi CRCHUM 2013
- Donnez pour la recherche
- Contactez-nous

COMMUNIQUÉ

MÉDAILLE DU JUBILÉ DE DIAMANT :

Un étudiant du CRCHUM honoré pour ses contributions scientifiques et sociales



Daniel Constantin Manolescu (au centre) en présence de l'honorable Pierre Duchesne, le lieutenant gouverneur du Québec et son épouse lors de la remise des médailles le 17 février 2013

M. Daniel Constantin Manolescu, étudiant au doctorat, a reçu la Médaille du Jubilé de Diamant de Sa Majesté la Reine Elizabeth II. Cette distinction a pour but d'honorer de façon visible et tangible, des canadiens et des canadiennes qui ont contribué à bâtir notre société.

Détenteur d'un baccalauréat (ing.) en sciences des aliments et d'une maîtrise en nutrition (liste du Doyen 2010), M. Manolescu poursuit son doctorat au CRCHUM sous la supervision du Dr. Pangala V. Bhat et du Dr Jean-Louis Chiasson, travaillant sur l'implication des rétinoïdes (Vitamine A, Acide Rétinoïque) dans l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2.

Monsieur Manolescu s'est notamment démarqué pour la qualité de ses recherches scientifiques et de son parcours académique obtenant plus de vingt bourses et prix d'excellence dont la bourse J.A de Sève d'excellence Ph.D. 2012 de l'Université de Montréal, 3 bourses d'excellence Ph.D. CRCHUM, une bourse Ph.D. provinciale Québec FRQS avec le 1er rang dans sa catégorie et une médaille d'argent-2012 des IRSC à l'échelle canadienne.

De plus, il s'est illustré pour son implication bénévole dans la communication et la vulgarisation scientifique pour prévenir le décrochage scolaire chez les jeunes, ainsi que dans plusieurs projets de protection environnementale.

Vitamin A derivative potentially treats type 2 diabetes and prevents its cardiovascular complications

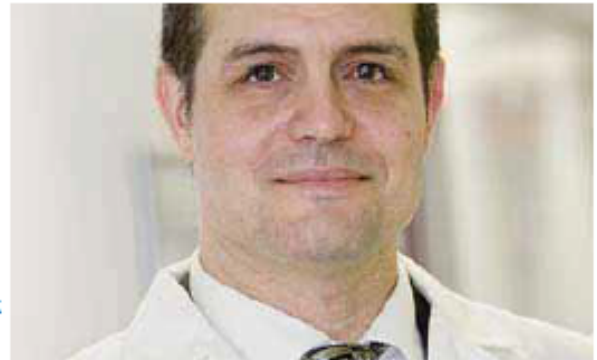


LUNDI, 16 JUIN 2014 13:28 NEWS

At a time when obesity, type 2 diabetes, and their complications are a veritable epidemic worldwide, researchers at the University of Montreal and CHUM Research Centre (CRCHUM) recently demonstrated the potential of retinoic acid (RA), a derivative of Vitamin A, in treating obesity and type 2 diabetes and preventing their cardiovascular complications. The findings were presented June 6, 2014 at the Annual Conference of the Canadian Nutrition Society in Saint John's, Newfoundland.

"In obese and insulin resistant mice, retinoic acid reduces the risk of cardiac apoptosis, stimulates the expression of cardio-protective genes reduced by the disease, and protects against the accumulation of collagen in the cardiac muscle, thus avoiding

the occurrence of fibrosis and possible associated future complications," says the first author of the study, Daniel-Constantin Manolescu. *Apoptosis* is the process of programmed cell death. The discovery follows other research conducted by his team on the effects of RA on insulin resistance, diabetes, and obesity. "Blood glucose, insulin resistance, body weight, and adipocyte size were significantly decreased in treated animals, including abdominal fat, while dietary intake and physical activity were similar for treated or non-treated animals. This suggests an increase in basal energy expenditure," says Manolescu.



Daniel-Constantin Manolescu

White fat is an energy reserve formed by the accumulation of fat in the form of triglycerides to meet unexpected increases in energy costs, but it is also a hormonal tissue with a delicate balance. Overall, if energy intake is greater than expenditures over an extended period, obesity increases, while hormonal balance and energy metabolism are disturbed. In this context, resistance to type 2 diabetes develops over time.

Brown fat also stores triglycerides, but it has the ability to produce heat. Abundant in babies, brown fat does not disappear completely in adulthood. It is irrigated by blood vessels and has many mitochondria, the energy factories of cells. Vitamin A derivatives stimulate a mitochondrial uncoupling protein (UCP1) that allows uncoupling of the mitochondria pathway (oxidative phosphorylation), which uses energy from the oxidation of nutrients for the production of adenosine triphosphate (ATP). For a period of time, they generate heat (thermogenesis) instead of ATP, which is traditionally the energy required for active metabolism. Exposure to cold leads to the stimulation of brown fat and white fat, promoting the conversion of triglycerides to free fatty acids and glycerol. However, in brown adipocytes, these fatty acids are rapidly oxidized in the mitochondria and produce heat (under the influence of the UCP1 protein). Brown fat thus helps to increase basal energy metabolism. As a result, hibernating mammals fatten in the fall without developing diabetes and lose weight without moving too much in the winter (while warming their den). They are also the animals that accumulate the most Vitamin A in their livers. Retinoic acid (a Vitamin A derivative) is recognized for its involvement in cell maturation and differentiation and may guide pre-adipocytes to become brown (or beige) instead of white. It is as if "boilers" were installed directly in reserves of white fat to melt it on the spot and prevent it from over-accumulating.

"Vitamine A is a bioactive nutrient. The originality of our project is in addressing obesity and type 2 diabetes through the involvement of retinoids. We have attracted international attention and were named among 12 teams in the world to bring conclusive data in this regard," says Dr. Pangala V. Bhat.

"Our studies on animals show that retinoic acid induces normalization of blood glucose and reduction of obesity. It is an important contribution to understanding RA action on the liver, fat, muscles, and the heart, and on retinoid metabolism, energy metabolism, fatty acid oxidation, and insulin resistance. Our research identifies new metabolic effects of retinoids

and may lead to anti-obesity and anti-diabetic medicines," says Dr. Jean-Louis Chiasson.

Note

The University of Montreal is officially known as Université de Montréal.

About the poster

The first author, Daniel-Constantin Manolescu was chosen first place among eight finalists in the 2014 national scientific abstract competition for student members of the Canadian Nutrition Society. He presented his scientific poster June 6, 2014 in Saint John's, Newfoundland. The findings were also published in *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-NRC*.

About the team

Dr. Jean-Louis Chiasson, Professor in the Departments of Medicine and Nutrition at the Université de Montréal and Head of Endocrinology at the CHUM (supervisor), Dr. V. Bhat Pangala (co-supervisor), Aurelia Sima (PhD candidate – Nutrition), Daniel-Constantin Manolescu (PhD candidate – Nutrition).

About Daniel-Constantin Manolescu

Daniel-Constantin Manolescu joined the Department of Nutrition of the University of Montreal's Faculty of Medicine following studies in Food Sciences at the University of Galati (Romania) and in Physiology/Endocrinology at CNRS/Musée d'Histoire Naturelle Paris and Université de Paris 7 (France). He is pursuing his doctorate (PhD) in partnership with CHUM Research Centre (CRCHUM). In 2012, he received the CIHR/CHRSF Silver Medal for Canadian scientific research and is currently a recipient of a doctoral scholarship from the Banting and Best Foundation.

References of cited publications:

- 1) "Natriuretic peptide and other cardio-protective genes are stimulated by Vitamin A (retinoid acid), preventing apoptosis and fibrosis in obese-diabetic mice heart" (Manolescu et al., 2014). Collaboration between the laboratoires of Dr. Jean-Louis Chiasson and Dr. Jolanta Gutkowska, CRCHUM. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/apnm-2014-0005>
- 2) "All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice" (Manolescu et al. 2010). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032483>

Media contact:

Benjamin Augereau

Press Attaché

Université de Montréal

Tel.: 514-343-6796

benjamin.augereau@umontreal.ca

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Remerciements au Comité de la thèse pour leurs appréciations :

Thèse :

Impacts métaboliques et thérapeutiques de la vitamine A, sous forme d'acide rétinoïque, dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 chez la souris ob/ob

Présentée par :

BSc (ing), MSc. **Daniel Constantin Manolescu** PhD. Médecine/Nutrition

Évaluée par :

Dre. Hélène Delisle PhD – Professeure emérite, Membre du Jury

1. *Cette thèse représente un travail soutenu et important sur un sujet d'importance potentielle en nutrition et santé humaine.*
2. *Le thème – impacts métaboliques et biomoléculaires de l'acide rétinoïque (AR) dans un modèle animal – est certainement innovateur.*
3. *Le plan est excellent !*
4. *La revue bibliographique est très détaillée et approfondie, surtout dans les aspects de biochimie moléculaire de l'acide rétinoïque.*
5. *Daniel-Constantin fait par cette thèse la preuve incontestable de ses aptitudes en recherche et de sa capacité autonome à mener des travaux.*
6. *Je suis satisfaite des réponses très détaillées que le candidat a données à mes commentaires et des modifications qu'il a apportées à sa thèse pour en tenir compte.*

Dr. Jean-Louis Chiasson MD – Directeur

1. *Une excellente révision de la littérature.*
2. *Les deux nouveaux papiers sont nettement améliorés. Félicitations !*
3. *Grandes aptitudes de recherche et capacité indépendante à mener des travaux.*

Dre Sylvie Mader PhD - Directrice

1. *Pas des problèmes de fondements et des méthodes dans la recherche.*
2. *Grandes aptitudes de recherche et capacité indépendante à mener des travaux.*

Dre. Lise Coderre (ensuite **Dr. Eric Thorin** – President Jury)

1. *Le candidat répond aux critères pour l'obtention d'un doctorat compte tenu qu'il a deux articles scientifiques publiés et un en cours (pour cette thèse).*
2. *La revue bibliographique est détaillée surtout dans les aspects de biochimie de l'acide rétinoïque;*

Dre. Ing Corinne Hoesli – Vérificatrice externe, Université McGill

1. *La pertinence du titre est appropriée à l'ouvrage pour des fins de catalogage.*
2. *Les résultats confirment l'effet de la vitamine A (AR) sur la masse corporelle tel qu'appuyé par des études précédentes. De plus, les résultats indiquent que l'administration de la vitamine A (AR), baisse les niveaux de ROL et de la RBP4 liant le rétinol dans le sang, (et de la RI), semble augmenter la quantité de tissus adipeux bruns vs blancs et mène également à des effets cardio-protecteurs.*
3. *La revue bibliographique est très complète. Puisque je ne travaille pas dans le domaine du diabète de type 2, je remercie M. Manolescu d'avoir offert une revue de littérature fondamentale exhaustive.*
4. *Le plan de travail et les méthodes utilisées sont adéquats. En général, les résultats sont suffisants pour appuyer les conclusions émises.*
5. *Les résumés sont concis et utilisent un langage scientifique approprié.*
6. *Les résultats sont bien interprétés et analysés.*



CENTRE COLLABORATEUR OMS SUR LA TRANSITION
NUTRITIONNELLE ET LE DÉVELOPPEMENT



Organisation
mondiale de la Santé

Montréal, le 14 septembre 2010

Bureau des bourses de la FESP

Mesdames, Messieurs,

Être éclectique tout en étant centré sur la recherche et réussir dans de multiples domaines à la fois : voilà le trait dominant du profil d'exception de M. Constantin Daniel Manolescu, candidat à la bourse Vanier. Outre ses réussites incontestables en recherche, comme en attestent son dossier académique, ses publications et les prix reçus, M. Manolescu s'implique non seulement en environnement, sphère en lien avec sa formation et certains de ses travaux de recherche, mais également dans le domaine des arts (cinéma, littérature), des sports (conditionnement physique), de la finance (gestion de valeurs mobilières), de l'enseignement et de la vulgarisation scientifique. Il fait beaucoup de bénévolat et a touché à ce titre une récompense prestigieuse du Canada. N'oublions pas non plus que M. Manolescu a fait preuve d'un courage et d'une pugnacité admirables puisqu'il a dû s'expatrier en raison des événements en Roumanie en 1989. Sa force de caractère, sa souplesse et son énergie sont sources d'émerveillement. Tout ceci, exposé plus en détail ci-dessous, fait de M. Manolescu un candidat idéal pour la bourse Vanier, qu'il mérite au plus haut point.

Excellence universitaire et potentiel en recherche :

Avec une note de 3,9 pour son dossier académique de M. Sc. en nutrition, obtenu en mars 2010, puis une note de 4,3 pour le séminaire de nutrition, seul cours suivi pour l'instant au niveau Ph.D., l'excellence académique du candidat ressort clairement. Il importe de signaler également, performance hors du commun, que M. Manolescu a déjà à son actif quatre articles scientifiques publiés ou acceptés sur son travail de recherche de M.Sc. en nutrition. Ce n'est pas pour rien qu'il a obtenu plusieurs récompenses au niveau de l'Université de Montréal et du CHUM entre 2008 et 2010.

M. Manolescu est foncièrement intéressé à la recherche, il a les dispositions pour réussir en ce domaine et il fait preuve d'une largeur de vue peu commune malgré son jeune âge. Sur une note plus personnelle, j'ai souvent discuté avec lui de recherche sur la vitamine A, puisque mes propres travaux portent d'une part sur la carence en vitamine A, d'autre part sur la montée des maladies chroniques telles que le diabète, en Afrique. M. Manolescu a toujours voulu et su faire les liens entre d'une part ses travaux de recherche fondamentale sur la vitamine A et le diabète et d'autre part, la recherche épidémiologique dans des pays en émergence. Ces discussions ont toujours été stimulantes et ont fait que j'ai pu remarquer les qualités exceptionnelles de cette personne sur de nombreux plans.


Hélène Delisle, Professeur titulaire et
Directeur de TRANSNUT, Centre collaborateur de l'OMS
Département de nutrition

CONFIDENTIEL

**PROGRAMME DE BOURSES DE FORMATION DE DOCTORAT
ANNÉE FINANCIÈRE 2012-2013**

Monsieur Daniel Constantin Manolescu

Au concours du 15 octobre 2011, 493 demandes de bourses de formation de doctorat ont été soumises à l'évaluation de 23 comités d'experts. Les experts de votre comité d'évaluation ont étudié avec attention les 18 candidatures en compétition. Votre dossier s'est classé au 1^{er} rang et vous avez obtenu une cote scientifique de 84.67 sur 100.

Chaque dossier est évalué sur un total de 100 points. Les évaluateurs doivent respecter les points attribués à chaque critère et sous-critère mais ils ont la liberté de fractionner chaque pointage.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ASSEMBLÉE UNIVERSITAIRE

Procès-verbal de la 548^e séance tenue le 18 mars 2013,
à 14 heures, à la salle M-415 du Pavillon Roger-Gaudry

<u>PRÉSIDENT :</u>	M. Guy Breton
<u>PRÉSIDENT DES DÉLIBÉRATIONS :</u>	M. Serge Larochelle
<u>SECRÉTAIRE :</u>	M. Alexandre Chabot
<u>CHARGÉE DE COMITÉ :</u>	Mme Anne Mc Manus

Le recteur termine son rapport en abordant le chapitre des honneurs. Il est fier de rapporter que plusieurs membres de la communauté universitaire ont été honorés au cours des dernières semaines.

Il souligne que plusieurs membres de la communauté universitaire ont reçu la Médaille du jubilé de diamant de la reine Elizabeth II :

- **Luc Vinet**, ancien recteur et professeur au Département de physique
- **Fahima Nekka**, professeur à la Faculté de Pharmacie
- **Daniel-Constantin Manolescu**, candidat au doctorat en nutrition
- **Bernard Beugnot**, professeur émérite au Département des littératures de langue française
- **Louis Maheu**, professeur émérite au Département de sociologie
- **André Bazergui**, professeur émérite au Département en génie mécanique à l'École Polytechnique Montréal
- **Sylvain Martel**, professeur au Département de génie informatique et de génie logiciel à l'École Polytechnique Montréal
- **Ke Wu**, professeur au Département de génie électrique à l'École Polytechnique Montréal

2015

03/02

Manolescu, Daniel-Constantin
(diét. nutr. méd., 2010)

Il a été sélectionné par les jurys scientifiques FRQS-CMDO parmi les meilleurs étudiants de doctorat sur l'axe cardio-métabolique, obésité, diabète au Québec, en 2014, pour représenter le Québec au Congrès organisé sur le sujet à Magog-Orford en février 2015.

03/02

Sima, Aurelia
(diét. nutr. méd., 2010)

Elle a été sélectionnée par les jurys scientifiques FRQS-CMDO parmi les meilleurs étudiants de doctorat sur l'axe cardio-métabolique, obésité, diabète au Québec, en 2014, pour représenter le Québec au Congrès organisé sur le sujet à Magog-Orford en février 2015.

Writing architecture following the Harvard University Communications

V- Check list for Thorough Revision for graduate manuscripts

Definition: Revision means « re-seeing » the document from the reader's point of view

Understandings and Credos:

- Revising means making changes that will better satisfy your purposes, your audience and your Thesis Committee.
- Editing means making surface level changes that make the document grammatically correct.
- Proof reading is checking the document to be free from typographical errors.

Consider to revise the draft three (3) times for:

1. Content and Clarity V

2. Organization and Layout V

3. Style and Tone V

Overall successful targets:

- Adapt the message to the specific audience. V
- Show the audience members how they benefit from your information. V
- Overcome any objections the audience may have. V
- Use a good attitude and positive emphasis. V
- Use visual to clarify or emphasise the material. V
- Specify what the audience should do to focus on priority goals. V

1. Content and Clarity check list:

- Does the document meet your needs (+university, readers) and make you look good? V
- Have you given readers all needed information to understand your message? V
- Have you organized your message for optimum positive audience impact? V
- Is all the information accurate? V Is each sentence clear? V
- Is the message clear, free from apparently contradictory statements? V
- Are generalizations and benefits backed up with adequate references or citations? V

2. Organization and Layout check list:

- Does the design of the document make it easy for readers to find the information? ✓
- Is the document visually inviting? ✓
- Are transitions between ideas smooth? ✓ Do ideas within paragraphs flow smoothly? ✓
- Are the most important points emphasized and alternatively repeated three times? ✓
- Are the first and last paragraphs effective for a clear take-home message? ✓

3. Style and Tone check list:

- Does the message build good will? ✓
- Is the message easy to read? ✓
- Is the message friendly and free from biased language? ✓

Acknowledgements:

Our special thanks for the valuable information and communications training goes to:

- 1) **ELSEVIER**, Scientific Communication, Editing Services and Tutorial Board.
- 2) **Dr Doreen Starke-Meyerring**, Scientific Communication professor, specialist in research writing, education and development and in doctoral writing – McGill University, Montréal, QC, Canada - for her precious advice on advanced rhetoric, scientific writing and discourse in academic, workplace, and public contexts.
- 3) **Harvard University**, The Center for Writing and Communicating Ideas
- 4) **Diocèse de Montréal**, M. l'abbé Robert Gendreau, rédacteur de « *L'Acolyte* ».

BSc. (ing), MSc. **Daniel-Constantin Manolescu** - PhD. Med/Nutrition

Droit de parole

Le Dr Pangala V. Bhat, PhD., notre directeur initial dans cette thèse de doctorat PhD. et également de notre Maîtrise Sc nous a offert quelques mots conclusifs à notre présent ouvrage:

Montréal, March 18 2017

Object: M. **Daniel-Constantin Manolescu**, PhD. Cdt,
Nutrition/Médecine, Université de Montréal

To whom it may concern,

As Director of the former laboratory of Cancer and Nutrition from CRCHUM University of Montréal, I supervised two PhD students, Mr. Daniel-Constantin Manolescu and Mrs. Aurelia Sima, from 2010 till my retirement on May 2014. I have known Daniel and Aurelia since 2006 and it is my pleasure to confirm their research autonomy and initiative. Our laboratory was specialized in the biology of retinoids and its deregulation in several chronic diseases. As such, I have trained Daniel and Aurelia in retinoid (ROL, RA) extraction methods from blood and tissues and HPLC quantitative measurements. Under my supervision, they performed work that was both original and of high quality, and has led to publication of several articles as well as several manuscripts in preparation. I have also trained them in project design and scientific writing.

Daniel's first article was published early on during his graduate studies in the Journal of Nutrition (Manolescu et al., 2010, Journal of Nutrition, 140 : 311-316), a leading journal in the field of retinoid metabolism. He contributed to this work interactively at multiple levels beyond conducting the experiments. This included research design, administrative management, literature review, interpretation and presentation of results, contributions to manuscript writing and responses to reviewers. The Acknowledgement in this paper means the work was performed under my supervision, and reflects the fact that, after team consultation, I took as the lab director the major design and manuscript decisions, as is common when training a graduate student. This does not detract in any way from Daniel's assiduous work in the lab and animal facility since already 2008, his initiative, critical thinking and intellectual contribution to the quality of the study. I have indeed acknowledged Daniel's important contributions by assigning him the legitimate right to include this paper in his PhD thesis as a published article.

Our first innovative goal in this project was to assess for the first time if retinoic acid may reduce the circulating levels of the retinoic binding protein RBP4 and as a consequence have an impact on insulin resistance and hyperglycemia in a validated animal model (*ob/ob*) of obese-diabetic mice. We did not perform insulin resistance or glucose intolerance curves in healthy animals, since nowadays these are well known homeostatic parameters in healthy mammals. Daniel took the initiative to take daily measurements of mice body-weight and food consumption, and to record adipocyte size post-mortem. These experiments gave us interesting indications on the impact of RA treatment on the evolution of appetite, body weight and fat content in mice. Daniel was responsible for the close monitoring of the spontaneous activity of mice in his cohorts, visiting them morning, day and night. He also increased the accuracy of these observations by asking two technicians to observe the animals in parallel as well. While at day 9 we already had valuable data for our first goal, Daniel took the initiative to

prolong the RA treatment experiment one more week. We thus obtained a better understanding of the duration of RA effects and made several other interesting observations too. While initially we had decided to concentrate only on blood, fat, muscle and liver, Daniel took the initiative to collect hearts, kidneys, and lungs. This allowed Daniel to have a more exhaustive range of observations and to develop valuable collaboration with other teams. An example is that RA treatment was found to prevent fibrosis and apoptosis in the heart in ob/ob mice, a paper that he published in collaboration with Dr. Jolanta Gutkowska's team (CRCHUM). Daniel performed RA treatments, insulin resistance and glucose tolerance tests shoulder- to-shoulder with the CRCHUM staff. He performed retinoid and immune-detection analysis and was responsible for the HPLC autonomous maintenance. Daniel also contributed to do paraffin embedding, slides and staining in all tissues. While Aurelia was the mathematician in our team, Daniel participated to all data interpretation, calculations, figures and tables. Under my supervision, he contributed original ideas to the first version of the manuscript and to the modifications performed in response to reviewers too.

In order to be published, this work was evaluated by three specialist reviewers, who improved on the final quality by asking for the normalisation (%) of insulin and glucose tolerance results, presentation of mean results for daily body weight and other data and the final choice of statistical analyses. This paper was published in 2010 in the prestigious American Journal of Nutrition, and has been cited by more than 60 times since. Daniel also contributed to a literature review book chapter on RBP4, obesity and insulin resistance that we have published together (Vitamin-Binding Proteins -Functional Consequences, CRC Press Francis and Taylor Group (ISBN/2013/2014)). To conclude I would like to mention that Daniel responded with enthusiasm and efficiency to his training in scientific writing. This allowed him to be very successful in his applications to scholarships and awards obtained during his PhD (more than 25, including CIHR and FRQS).

In conclusion, I hope that this letter will lift any doubt expressed by jury members as to the research initiative and eventually autonomy shown by Mr Manolescu, and am highly supportive of his candidacy for the grade of Ph.D. in Nutrition/Médecine.

Sincerely yours,

Pangala V. Bhat, Ph.D.
Professeur Titulaire (retired),
Department of Nutrition,
Université de Montréal
pangala.v.bhat@umontreal.ca

Notre protocole de validations de nos articles par les pairs jusqu'à la publication

- 1) **Première rédaction** en anglais, texte brut, figures, légendes et mise en page.
- 2) **Première exposition aux pairs IM** : « *Intra Muros* » - Université de Montréal
 - présentation par affiche ou orale dans une manifestation scientifique de base (ex : Journée scientifique facultaire, Centre de recherche ou Université)
 - niveau de sélection : moyen mais contingenté quand même, avec jury
 - collection de critiques, discussion avec l'équipe et ajustement de la rédaction.
- 3) **Deuxième exposition aux pairs** : « *Extra Muros* » - Congrès avec jury expert
 - (ex. affiche ou oral, congrès provincial, régional, national ou international)
 - niveau de sélection 1 : élevé, très élevé et supérieur respectivement
 - niveau de sélection 2 : excellence pour compétition (ex.: prix, médailles)
 - collection de critiques, discussion avec l'équipe et ajustement de la rédaction.
- 4) **Troisième exposition aux pairs** : 1-publication de résumés, 2-concours de financement
 - niveau de sélection 1 : très élevé, publications indexées d'*Abstracts* avec jury
 - (I^{er} niveau de publication, permet de sécuriser les données préliminaires)
 - niveau de sélection 2: excellence pour compétition (bourses avec jury)
 - collection de critiques, discussion avec l'équipe et ajustement de la rédaction.
- 5) **Quatrième exposition aux pairs** : I^{er} soumission du manuscrit magistral *in extenso*
 - niveau sélection: très élevée, publication d'article avec des réviseurs de spécialité
 - collection de critiques, discussion avec l'équipe et ajustement de la rédaction.
 - II^e et III^e soumissions, collection de critiques, discussions et ajustements.
- 6) **Publication de l'article *in extenso*** : maximum au 4^e tour de soumission.
 - niveau de sélection: très élevée, publication d'article, avec réviseurs de spécialité
 - tout a été vérifié, corrigé et optimisé (design, méthodologie, écriture, édition)
- 7) **Ouverture aux commentaires post-publication** : Nos articles publiés ont été étudiés et cités de 20 à 50 fois, par plusieurs équipes de recherche dans notre spécialité et domaines connexes. Leurs commentaires sont positifs et aucune contestation ou demande d'errata n'a été faite contre nos méthodes, discussions ou conclusions.

Note 1: Les preuves de ce protocole (publications, congrès, compétitions et prix) suivent.

Note 2 : Pour avoir été ajustés par plusieurs dizaines de pairs, des concours et des congrès de spécialité, vérifiés par cinq jurys d'experts jusqu'à la publication, et ensuite cités par 10 à 50 équipes nous espérons, en toute modestie, nos articles publiés éprouvés contre des fautes de méthodologie ou de conception. C'est l'objectif de toutes ces vérifications rigoureuses.

BSc. (ing), MSc. *Daniel Constantin Manolesco* PhD.Cdt.

Concept d'optimisation de la recherche: Integration Systemique des Variables-ISV / VSI

« Le néxialisme est une science qui a pour but de coordonner les éléments d'un domaine de la connaissance avec ceux des autres domaines. Il offre des moyens d'accélérer le processus d'absorption de la connaissance et d'utiliser efficacement ce qui a été appris, permettant d'articuler les savoirs de manière composite pour trouver des solutions originales aux problèmes posés et dégager de nouvelles pistes » - E. van Vogt 1950, Toohey KD.2013.

Systemic comparative investigations: physiology, histology, cellular, metabolomics, proteomics, genomics, atomic & sub



Photos artisanat slave « *Matrioska* » – Artistes anonymes ; Russie, Ukraine, Manolescu DC 2018.

Modèles d'investigation ; Théories de la connaissance, des systèmes et de l'optimisation

Nos méthodes d'investigation intègrent l'observation, les mesures directes et indirectes et la bibliographie pour recueillir des données ayant de l'intérêt scientifique. Dans la tradition de la biologie des systèmes, nos interprétations subséquentes procèdent par des analyses comparatives systémiques et intégratives de variables, des syllogismes et des optimisations.

L'analyse systémique (nommée aussi « approche systémique ») réfère à l'étude interdisciplinaire de données et de leurs liens dynamiques, vus dans des structures (systèmes) successives d'organisation (un peu comme les poupées russes). Pour déduire ou expliquer des propriétés nouvelles d'un système (qui n'est pas seulement la somme de ses parties) l'analyse systémique regarde : les niveaux d'organisation de la matière, les échanges entre les parties, la compétition, la complémentarité, l'association, la symbiose, les synergies, les facteurs de déséquilibre, les facteurs et états d'équilibre, les boucles évolutives des syllogismes et le devenir de systèmes. Les anciens philosophes (Platon « *Théorie de la connaissance* » en 400 av. J.C. ou encore Lao Tseu en 300 av.J.C. avaient intuitivement remarqué que le corps représente plus que la somme de ses organes. Plus proche de nous, la théorie générale des systèmes (TGS) a été énoncée par le biologiste Ludwig von Bertalanffy dans son livre « *Problems of Life* » (1960, Ed. New York, USA). Il l'a ensuite développée dans son traité « *The General System Theory* » (1968, Ed. New York, USA) et publiée également en français sous le titre « *La théorie générale des systèmes* » (1973, Ed. Paris, France). Un survol élémentaire de la TGS (Rabega M.C. et al.1983) rappelle le passage du non-vivant au vivant, et le fait que nous n'avons pas à redémontrer (à répétition) par mesures directes « les propriétés acquises du vivant ». A la base

de la TGS se trouve le concept que toute la matière de l'Univers (vivante et non vivante) est organisée de façon systémique, donc structurée par systèmes qui interagissent de façon hiérarchique. Le Dr Ilya Prigogine (Nobel 1977 chimie), professeur de thermodynamique chimique à l'Université de Bruxelles, énonce deux types de systèmes (fermés et ouvertes) selon leurs échanges avec l'extérieur (Rabega M.C. et al.1983).

Les systèmes isolés ou fermés (SF) - Un système est dit « fermé », lorsque ses liens avec le milieu externe se résument à des échanges énergétiques. Par exemple l'air, réchauffé par la combustion d'un échantillon dans un cylindre calorimétrique étanche, cèdera seulement de l'énergie calorique vers l'eau ambiante à l'extérieur, et ce jusqu'à l'équilibre thermique entre les deux (principe du calorimètre de Lavoisier). Selon la thermodynamique, les systèmes fermés tendent naturellement vers un état où leur énergie libre devient minime, via un changement majeur (entropie ; S). Le terme « entropie » (Clausius RJE, 1865) encode l'ampleur de ce changement d'état thermodynamique. Pour vulgariser l'entropie, on en parle comme de « l'état de désordre » des éléments d'un système. Par exemple, l'entropie est grande pour les atomes et les molécules de gaz à l'état pur, qui se déplacent de façon désordonnée dans toutes les directions possibles, mobilisant une grande énergie. En revanche, l'entropie est petite pour les atomes et molécules intégrés (en ordre) dans des réseaux (ex : structures cristallines) qui peuvent faire seulement de petits mouvements vibratoires limités autour de leurs positions d'équilibre dans le réseau, mobilisant donc une énergie minime. Dans l'Univers, la valeur de l'entropie augmente dans les transformations irréversibles d'un système isolé ou reste constante dans les transformations réversibles de ce système. Les processus physiques et chimiques (y compris bio) sont dits « réversibles » ou « aller-retour » lorsqu'ils peuvent se produire à double sens. Ils sont dits « irréversibles » lorsqu'ils peuvent se produire à sens unique, seulement. Ces transformations proviennent de la tendance (naturelle) de systèmes de passer d'un état riche en énergie mais instable (désordonné) vers un état plus pauvre en énergie mais plus stable (plus ordonné). La variation de l'entropie (ΔS) est considérée nulle ($\Delta S=0$) dans les transformations réversibles, et négative ($\Delta S < 0$) dans les irréversibles. En résumé, l'état de désordre des éléments d'un système à grande entropie reflète une probabilité maximale de déséquilibre, ce qui mobilise une grande énergie, alors que l'état d'ordre des éléments d'un système à petite entropie reflète une probabilité minime de déséquilibre, ce qui mobilise une énergie minime. Cela renvoie au concept d'homéostasie. Lorsqu'il y a échange d'énergie, entre un système fermé avec des systèmes voisins, la quantité d'énergie cédée est égale (en valeur absolue) à celle de l'énergie reçue, car dans l'Univers l'énergie ne peut ni se créer, ni se détruire, mais seulement passer d'une forme à l'autre. Au cours d'une transformation d'un système fermé, la variation de son énergie est égale à la quantité d'énergie échangée avec le milieu extérieur par transfert thermique et/ou transfert mécanique. C'est le premier principe de la thermodynamique, le deuxième disant que l'entropie de l'Univers est en continuelle croissance. L'énergie totale de l'Univers, elle, est toujours constante !

Les systèmes ouverts (SO) – Un système est dit « ouvert » **lorsque** ses liens avec le milieu externe dépassent les seuls échanges énergétiques, intégrant aussi des échanges de matière et d'information. Passer de systèmes « fermés » à « ouverts » a peut-être constitué un petit pas pour la thermodynamique, mais certainement un pas de géant pour la Vie. Car les principaux systèmes ouverts sont des organismes vivants ! En effet, les organismes vivants font partie de systèmes biologiques (biosystèmes) qui sont des systèmes ouverts (à degrés variables). A ce titre, ils « négocient » en permanence et de façon complexe un équilibre temporaire (« *steady state* ») avec leur milieu environnant. C'est le paradoxe du vivant que de « garder son identité, tout en changeant continuellement quelque chose dans sa structure » par des échanges d'énergie, de matière et d'information avec l'extérieur. Héraclite (500 av. J.C.) donne une image suggestive de cette définition, comparant l'organisme vivant à une rivière qui semble identique, tout en transportant des molécules d'eau différentes à chaque instant. L'individu biologique est « l'unité élémentaire d'existence, donc d'organisation, conservation et reproduction de la matière vivante » (Botnariuc N.1976). Pour maintenir l'état d'ordre de leurs éléments afin de survivre, les organismes vivants (biosystèmes) doivent aussi réduire les risques de déséquilibre et dépenses énergétiques afférentes, donc minimiser leur entropie. Pour ce faire et maintenir ainsi leur équilibre (homéostasie), ils « consomment » de l'entropie négative ($-S$ « néguentropie ») pour compenser l'entropie élevée ($+S$) à laquelle ils sont soumis par les diverses « pressions d'échanges » venant de l'environnement. Bref, à la tendance naturelle d'augmentation de l'entropie (désordre), s'opposent les diverses stratégies des biosystèmes pour l'organisation et l'ordre (néguentropie) afin de rétablir l'équilibre (homéostasie). Ce qui demande une dépense d'énergie ! Les « gagnants » sont bien évidemment ceux qui arrivent à diminuer (voire éviter) une trop grande pression de survie venant de désordres (entropie), tout en réussissant à mobiliser des stratégies organisées (néguentropie) nécessaires pour rétablir l'équilibre (homéostasie) et ce avec un minimum de dépense énergétique. Les « gagnants » ont un meilleur « rendement » de survie, faisant preuve d'un maximum d'efficacité avec un minimum de dépenses énergétiques. C'est l'optimisation ! L'opportunisme énergétique est un outil d'optimisation dans la loi de conservation de l'énergie du vivant, pour garder l'homéostasie avec un minimum de dépenses.

Avec le déroulement de leur vie, les biosystèmes se retrouvent dans un état d'augmentation de l'entropie et de diminution de la néguentropie. Avec le vieillissement, ils dépensent de plus en plus d'énergie pour retrouver un équilibre (homéostasie) de plus en plus précaire. Leur qualité et durée de vie dépendent de leur capacité à optimiser leur rendement afin d'avoir une meilleure efficacité énergétique dans ce processus. Leur efficacité énergétique diminue avec le temps, donc leur « rendement » de survie diminue. Ils vont rester en vie tant et aussi longtemps qu'ils sont encore capables d'extraire et consommer de l'entropie négative ($-S$) du milieu environnant. Sinon, ils vont mourir. Introduisant la notion de retrorégulation dans le vivant (*bio-feed-back*), le mathématicien Norbert Wiener, concepteur de la cybernétique (1948), disait que : « rester en vie exige de nager de façon thermodynamique à contre-courant (anti-entropique) dans une Niagara d'entropie en augmentation ». A la mort, l'entropie des

biosystèmes est maximale, leur néguentropie est nulle et leurs réserves (énergie, substance, information) sont en voie de transfert irréversible vers d'autres biosystèmes (saprophages) de l'environnement qui les prennent en charge. On pourrait compléter avec la fonction « d'enthalpie » (H) qui correspond à l'énergie totale (J) d'un système thermodynamique. C'est l'énergie interne d'un système, son « potentiel thermodynamique », qui entre en jeu lors des changements « entropiques » (physiques, chimiques, biologiques) qui engagent son énergie. Par exemple, pour garder son volume, à pression constante, la variation d'enthalpie correspond à la chaleur absorbée (ou dégagée) : $\Delta H = Q_p$. La ΔH est positive dans les réactions endothermiques (absorbant de la chaleur) et négative dans les réactions exothermiques (la dégageant). Les organismes « biosystèmes » homéothermes dégagent de la chaleur !

Tous les biosystèmes sont organisés par niveaux hiérarchiques successifs et intégrés dans une fonctionnalité globale. C'est le cas pour les niveaux biomoléculaires (génomiques, protéiniques, métabolomiques), anatomiques (cellulaire, histologique, organes, appareils et systèmes) et physiologiques, qui concourent à la réalisation de l'équilibre global du métabolisme et des fonctions du corps. On peut également intégrer, en descendant, les niveaux atomiques et subatomiques. Leurs profils vibratoires d'équilibre énergétique en association avec l'état global de « santé » ou de « maladie », concerneront peut-être la médecine de demain, même si l'homéopathie et l'acupuncture s'y intéressent déjà. Ces niveaux d'intégration diffèrent entre les biosystèmes individuels simples (ex : unicellulaires, pluricellulaires) ou plus complexes (végétaux et animaux). Ensuite, les individus biologiques eux-mêmes appartiennent à des structures biologiques supérieures et interactives, comme les populations, les espèces, les biocénoses, les écosystèmes et la biosphère terrestre. L'humain appartient à ce grand complexe et il faut toujours l'analyser dans ce contexte de causalités.

Le concept d'optimisation dans la Loi de conservation de l'énergie du vivant fait référence à un maximum d'efficacité biofonctionnelle obtenue avec un minimum de dépense de substrats énergétiques. Tous les biosystèmes ont une tendance innée d'opportunisme énergétique, qui tend vers cette efficacité. Évidemment, ils y arrivent plus ou moins selon les contraintes environnementales. De façon réductive (mais néanmoins biothermodynamique exacte), on peut dire que pour vivre le plus longtemps possible, il faut trouver des substrats énergétiques qui permettent à nos mitochondries d'augmenter leur rendement tout en diminuant l'excès de résidus oxydatifs ROH (donc de produire le maximum d'énergie par l'oxydation la plus complète d'une quantité minime de substrat) et ainsi fonctionner en régime d'efficacité énergétique optimale le plus longtemps. Mathématiquement, comme chacun le sait, tout problème **d'optimisation** touche aux calculs de **programmation linéaire** (Bebea N., 1978), dont le but premier est de chercher les valeurs extrêmes (max. ou min.) d'une fonction linéaire de « n » variables :

$$F = c_1x_1 + c_2x_2 + \dots + c_nx_n$$

mais à la condition que les dites « n » variables satisfassent un système (S) contraignant de « m » restrictions exprimées comme inéquations (ou équations) linéaires de type :

$$St$$

$$\max (\min)[f] = \max(\min) \left[\sum_{j=1}^n c_j x_j \right]$$

$$(S): \begin{cases} \sum_{j=1}^n a_{ij} x_j \leq b_i \\ x_j \geq 0; i=1, 2, \dots, m; \end{cases}$$

Les biosystèmes sont des systèmes de données et relations « *multivariables* ». La complexité du monde vivant oblige souvent à des « *négociations* » d'optimisation entre les valeurs extrêmes de deux ou plusieurs fonctions multivariables. La modélisation mathématique de ces phénomènes passe par des « couples » de problèmes de programmation

objective prends une valeur **maximum**, dans le système de restrictions (**S**) :

$$f = \sum_{j=1}^n c_j x_j \quad (\text{S}): \begin{cases} a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1n}x_n \leq b_1, \\ a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2n}x_n \leq b_2, \\ \vdots \\ a_{m1}x_1 + a_{m2}x_2 + \dots + a_{mn}x_n \leq b_m, \\ x_j \geq 0; j = 1, 2, \dots, n. \end{cases}$$

On peut alors écrire la matrice (A) du système (S) sous la forme suivante :

$$A = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & a_{m2} & \dots & a_{mn} \end{vmatrix}$$

Les systèmes multivariables se caractérisant par des données et des interactions multiples, on pourrait se retrouver devant un deuxième problème d'optimisation « **g** », qui utilise les mêmes données que le problème « *primaire* », étant en relation de « *dualité* » avec lui. Considérant qu'il y a « **m** » variables (**y**₁, **y**₂..., **y**_{**m**}) correspondant aux « **m** » inéquations du premier système de restrictions (**S**), le problème « *dual* » pourrait consister à déterminer les « **m** » valeurs **y**_{**i**} (**i**=1, 2, ..., **m**) pour lesquelles « **g** », la deuxième *fonction objective*, prend une valeur *minima* cette fois, dans un deuxième *système de restrictions* (**SI**) :

$$g = \sum_{i=1}^m b_i y_i \quad (S_1): \begin{cases} a_{11}y_1 + a_{21}y_2 + \dots + a_{m1}y_m \geq c_1, \\ a_{12}y_1 + a_{22}y_2 + \dots + a_{m2}y_m \geq c_2, \\ \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\ a_{1n}y_1 + a_{2n}y_2 + \dots + a_{mn}y_m \geq c_n, \\ y_i \geq 0; (i=1, 2, \dots, m). \end{cases}$$

Alors la matrice « AI » du système (S_I) est transposable à la première matrice « A » :

$$A_1 = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{21} & \dots & a_{m1} \\ a_{12} & a_{22} & \dots & a_{m2} \\ a_{1n} & a_{2n} & \dots & a_{mn} \end{vmatrix}$$

Dans les deux problèmes d'un « couple dual » les constantes sont les mêmes, soit (c_j , a_{ij} et b_i), alors que le nombre des variables (x_j , y_i) fluctue de « n » vers « m » et celui des restrictions fluctue dans le sens contraire, soit de « m » vers le « n ». Pour simplifier les choses on peut écrire les deux problèmes d'un « couple dual » sous forme matricielle, soit :

1. Problème primaire :

$$\max f = \max C'x, \quad \text{et restrictions: } \begin{cases} AX \leq B, \\ X \geq 0 \end{cases} \quad \text{dont } B = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \end{bmatrix}, \quad C' = ||c_1, c_2, \dots, c_n|| \quad \text{et } X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{bmatrix}$$

2. Problème dual :

$$\min g = \min B'y \quad \text{et restrictions: } \begin{cases} A'y \geq C, \\ y \geq 0, \end{cases} \quad \text{avec } y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_m \end{bmatrix}$$

et $B' = ||b_1, b_2, \dots, b_m||$

Selon le **théorème fondamental de la dualité**, pour tout « *couple* » de problèmes duaux est possible une seule et unique parmi les trois situations suivantes :

1) Si les deux problèmes ont des solutions réalisables, alors les deux ont des solutions optimales et les valeurs absolues de leurs **fonctions** « *objectifs d'efficacité* » coïncident; $\max C'X = \min B'Y$; **2)** si le problème initial (ou prioritaire) n'a pas de solutions réalisables, alors les solutions « *optimum* » de l'autre problème du « *couple dual* » tendent vers l'infini (∞); **3)** aucun des deux problèmes de la « *dualité* » ne possède de solutions réalisables.

Loin de compliquer les choses, la dualité des problèmes d'optimisation possède des avantages :

1) la transformation du résultat **min.** d'une fonction linéaire en **max.** et réciproquement ; **2)** la réduction de volume de calculs par choix de l'algorithme le plus court des deux ; **3)** l'épreuve d'exactitude des résultats individuels, en résolvant le problème « *dual* ». En conclusion, la modélisation mathématique des phénomènes d'optimisation (y compris de transports et autres provenant de biosystèmes) met en évidence des relations multivariées. Les structurer en problèmes de programmation linéaire permet de trouver des solutions optimales en procédant à leur résolution par différentes méthodes spécifiques. La méthode graphique (géométrique) fonctionne très bien s'il existe deux variables « *inconnues* ». Pour $n = 3$ variables « *inconnues* », la représentation graphique devient plus difficile, alors que pour $n > 3$ variables « *inconnues* », elle devient carrément impossible. Toutefois, dans la pratique les modèles mathématiques des problèmes de programmation linéaire contiennent plus de $n > 3$ variables « *inconnues* » (comme dans vraie la vie). On utilise alors d'autres méthodes dont la plus courante est la méthode « *Simplex* » (Dantzig G.B. 1947, Serpil G. et al. 2014). Elle permet une exploration systématique des algorithmes de base, l'amélioration successive d'un algorithme, le passage (*itération*) d'un algorithme à un autre meilleur (ex : l'obtention d'une valeur plus grande pour la **fonction** « *objectif d'efficacité* » en appliquant un **pas** de plus dans un problème de « *maximisation* » et,

respectivement, l'obtention d'une valeur plus petite pour la **fonction** « *objectif d'efficacité* » en appliquant un ***pas*** de plus dans un problème de « *minimisation* »).

De ces brefs survols nous aurons compris que les « *systèmes ouverts* », dont les organismes vivants (des biosystèmes), fonctionnent selon les théories des **systèmes** et de **l'optimisation** énergétique. Dans la recherche biologique, nous avons avantage à les explorer selon leurs lois naturelles de fonctionnement. Nous allons ainsi être orientés plus rapidement sur des voies d'intérêt majeur, nos dépenses seront moindres et la moisson de résultats probants (ou du moins intéressants à creuser davantage) sera plus abondante. Cela exige bien sûr de la ténacité à « *réitérer* » nos revues de littérature, pour enrichir nos bases de données, nos variables d'intérêt et implicitement les syllogismes « *heureux* », améliorant ainsi nos « *algorithmes méthodologiques* » de recherche. Mais la Nature elle-même fonctionne ainsi, alors « *optimisons* » à notre tour. Explorons des associations et des syllogismes non seulement sur des axes « *longitudinaux* » et « *transversaux* » mais aussi « *verticaux* » ou « *systémiques* » dont la fonctionnalité « *par défaut* » a déjà été définie par la Nature. Bien sûr, dans notre Univers tout système à son lot de relations multivariées peu (ou pas) connues, qui tiennent des équations « *non linéaires* » et de l'imprévisibilité. Une excellente vulgarisation à ce sujet est donnée par le Dr Launay Frédéric (Université de Nantes) dans son cours sur les « *Systèmes non linéaires* ». Il en tient de l'expérience, de l'inspiration et de la « *maestria* » de chacun à jongler avec (ou à découvrir) de nouvelles variables d'intérêt et leurs « *fonctions objectifs* » les plus « *parlantes* » ainsi que les conditions « *restrictives* » les plus réalistes qui permettent de bâtir les meilleurs systèmes d'optimisation. Il est souvent intéressant d'étudier un phénotype intermédiaire (ex : métabolomique, histologique) pour renforcer une première association des données biomoléculaires (ex : profils d'expressions géniques, protéiniques) et des profils physiologiques (ex : marqueurs de l'état santé et/ou maladie). Sachant que ces variables sont structurées dans un biosystème hiérarchique et fonctionnel (végétal, animal ou humain), des associations spécifiques successives nous suggèrent des hypothèses de causalité à grande probabilité. La physiologie comparée nous guide, comme l'organogenèse, car l'ontogénie résume en partie la phylogénie. On peut ensuite « *optimiser* » avec des techniques moins chères, et toutefois probantes, pour vérifier nos hypothèses. Nous avons appelé cet exercice d'optimisation de variables O.C.S.I.V. pour Optimisation Comparée, Systémique et Intégrative de Variables ou I.S.C.O. de « *Integrative Systemic and Comparative Optimization* » pour forcer un peu l'acronyme à l'envers en anglais. Il s'agit d'une mise en commun intégrée des concepts dynamiques de la biologie comparée des systèmes d'Aristote, Colin, Botnariuc et Wiener, couplés aux algorithmes d'optimisation de la programmation linéaire de Dantzig. Vous corrigerez nos équations mathématiques si vous les trouvez trop osées et nous vous remercions. Reste toujours que l'ancienne méthode « *trial and error* » de recherche, des nouvelles molécules d'intérêt pour les biotechnologies, est dépassée par les méthodes « *target* » de criblage à haut débit profilé de molécules. Les associations « *fonctionnelles* » des « *omics* » (génomique, protéomique, métabolomique) avec des profils « *santé* » et « *maladie* » sont ensuite mises à profit, autant sur un plan individuel qu'intégré. Avec l'arrivée de la bio-informatique, ces

concepts ont ouvert la voie à la génomique fonctionnelle, à la pharmacogénétique, aux analyses de flux et de contrôle métabolique et au génie génétique. Il est donc logique d'appliquer les mêmes concepts de base (comparatif, systémique et intégratif) dans nos recherches courantes. Guidés par les règles fondamentales de l'ergonomie de systèmes, dans la circulation et la conservation de l'énergie et de la matière, nous avons proposé quelques modestes équations d'optimisation également.

Législation de la propriété intellectuelle, des droits d'auteur et des citations

Des droits de propriété intellectuelle trop restrictifs ont souvent constitué des monopoles sur l'information ou les créations, au détriment d'un libre accès du public à la culture ou à la science. Nous souscrivons donc au mouvement du libre accès, qui propose des modèles alternatifs d'exercice de la propriété intellectuelle, dont les publications scientifiques qui, rappelons-le, sont financées par des fonds publics ! Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document, ainsi que l'obligation de conserver l'exactitude de l'information originale, les contrefaçons, modifications majeures ou traductions hasardeuses étant prohibés. Par conséquent les citations « en original » sont à prioriser pour les figures et noms (génomique, protéinémie, métabolomique). Si besoin de traduction il y a, il implique une obligation de rigueur linguistique et sémantique. L'acquiescement à ces valeurs est habituellement donné par l'ajout de l'énoncé : « **sans préjudice aux droits d'auteur** » en début de l'œuvre ou pour les citations des figures. Il va de soi que nous souscrivons au même respect de propriété intellectuelle des autres, dans l'exercice de nos droits pour citer leurs travaux (ex.: textes, figures). Une longue expérience de 4 ans dans le monde de l'édition en France à Paris, nous a permis de très bien connaître ces règles. L'Université de Montréal (FESP) souscrit aussi à ces principes pour ses thèses :

- 1)<http://guides.bib.umontreal.ca/disciplines/25-Droit-d-auteur>,
- 2)http://guides.bib.umontreal.ca/ckeditor_assets/attachments/original/droit-dauteur.pdf
- 3)http://histart.umontreal.ca/fileadmin/Documents/FAS/histoire_art_etudes_cinematographiques/Documents/3-Ressources-services/Ressources-formulaires/protocole-biblio-har.pdf
- 4)<http://www.faecum.qc.ca/ressources/avis-memoires-recherches-et-positions-1/politique-sur-la-propriete-intellectuelle-de-l-universite-de-montreal> -

« Lorsqu'il y a relation entre un étudiant de l'UdeM et un chercheur d'une autre université, la « **Politique sur la propriété intellectuelle** » de l'UdeM à **priorité** et s'applique ». Y compris pour des vérifications externes. (Tiré des réglementations FESP, FAECUM, Université de Montréal 2013)

Concept philosophique pour diminution des conflits d'intérêts et des biais émotionnels

En tant que Ph.D.(*Philosophiae Doctor*) candidat, nous trouvons notre inspiration dans les courants philosophiques issus de la « *Théorie de la Connaissance* » de Platon (- 428; - 347 A.D.). Nous privilégions donc la rigueur du savoir éprouvé face aux conclusions imposées par l'empirisme, les émotions ou les partisans. Selon Platon les réalités naturelles, ou artificielles « saisissables » et celles qui sont abstraites (comme les mathématiques), coparticipent harmonieusement au monde intelligible. Dans ses « *Dialogues* » il introduit l'*Éristique*, du grec « *eris* » - controverse et « *techne* » - procédé, comme un art du débat philosophique, un outil pour la recherche de la connaissance. Le concept est consacré par Euclide de Mégare (- 450; - 366 A.D.), fondateur d'une école post-socratique en Grèce. Malheureusement, depuis le XVIIIe siècle l'époque moderne l'a déformé en moyen rhétorique d'atteindre - par la controverse fallacieuse et le sophisme - des avantages pratiques. Déçu, le philosophe Arthur Schopenhauer (1788-1860) écrit, en 1831, une « dialectique éristique » ou « l'art » d'avoir toujours raison « *Die Kunst, Recht zu behalten* ». Selon lui, les êtres humains ne discutent plus pour chercher la vérité, ou le savoir, mais tout simplement pour la vanité de l'emporter sur leurs congénères. C'est la définition du « *power trip* » moderne ! Alors il dénonce tout un grimoire de recettes de mauvaise foi, où logique et dialectique sont amalgamées et les entorses sophistes sont bienvenues, afin de frapper « en dessous de la ceinture » dans une controverse. A l'opposé nous privilégions l'*Érhystmique*, méthode recherche philosophique par dialogue constructif et la réflexion synergique, où un point de vue contraire n'est plus un ennemi à démolir (comme dans l'*Éristique*). Il est plutôt relativisé et devient une référence marginale. Dans l'intervalle dialectique ainsi établi, la recherche d'informations, et des repères probants, bénéficie d'un évident élargissement de perspective (Manolescu D.C., 2008). Dans un esprit néxialiste, nous privilégions l'analyse comparative systémique et intégrative des variables, un excellent outil d'optimisation dans la recherche. Bonne lecture !

Daniel Constantin Manolescu- BSc. (Ing), MSc, PhD.

Déclaration commune :

Montréal, le 27.fevrier.2018

BSc.(ing.)MSc. **Daniel-Constantin Manolescu** PhD-Cdt. Nut/Med, Univ.de Montréal
BSc.(ing.)MSc. **Aurélia Sima** PhD-Cdt. Nutrition/Med, Université de Montréal

Objet : Réservation de droits d'usage en intérêt commun, pour avantages réciproques, et en toute circonstance, de nos œuvres de recherche scientifiques et leurs produits dérivés.

Bases légales : Politique relative aux conditions de présentation des mémoires et thèses (formats classique, par article(s) et hybride), résolution CEFM-16-3961 du 13 octobre 2016 de la Faculté de Médecine, et les réglementations FESP, Université de Montréal. Législations canadienne et internationale des droits de propriété intellectuelle, en vigueur.

Madame, Monsieur,

Nous soussignons, Daniel-Constantin Manolescu et Aurélia Sima, ci-appelés « les déclarants », candidats au doctorat en Nutrition, certifions avoir fait le premier dépôt de nos thèses en conformité avec les bases légales ci-haut mentionnées. Les titres de nos thèses et les publications de nos candidatures se détaillent comme suite :

1. Thèse « Impacts métaboliques et thérapeutiques de la vitamine A, sous forme d'acide rétinolique, dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 chez la souris ob/ob », par Daniel-Constantin Manolescu, avec 4 publications :

a) Article 1: « *All-trans Retinoic Acid Lowers Serum RBP4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice* », **Manolescu DC, Sima A et Bhat PV.** publié, *Journal of Nutrition* ASN, 2010. PubMed (PMID: 20032483).

b) Article 2: « *Retinoic Acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy and promotes beige/brown fat characteristics in diabetic mice* », **Manolescu DC, Sima A, Mader S and Chiasson JL** données préliminaires publiées en abstracts indexés (APNM 2012, 2015), *manuscript global, edited for submission*, par **ELSEVIER**.

c) Article 3: « *All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice* », **Manolescu DC, Jankowski M, Danalache B.A., Wang D., Broderick T.L., Chiasson J.L. and Gutkowska J.,** publié APNM /NRC Press, 2014, PMID: 25017112

d) Publication 4: « *RBP4 dans l'obésité, la RI et le diabète de type 2* »- Chapitre 2 de la revue de littérature, publié « *Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance* » par **Manolescu DC et Bhat PV**, CRC Press 2014 -ISBN : 9781439880166

2. Thèse « Métabolisme des rétinoïdes et facteurs d'influence dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Études chez l'animal et chez l'homme », par Sima Aurelia avec 3 publications :

a) Article 1 «*Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues* », **Sima A, Manolescu DC, Bhat PV,** publié, *Biochem&Cell Biology* 2011. PMID: 22077479

b) Article 2: « *Circulating retinol binding protein (RBP4) is increased in obesity, insulin resistance and in type 2 diabetes mellitus* » - **Sima A, Manolescu DC, Mader S** and Chiasson JL, données préliminaires publiées en *abstracts* indexés (APNM 2012, 2015), manuscrit global en soumission à l'APNM.

c) Article 3: « *The relationship between circulating vitamin A (retinol) and insulin resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus* » - **Sima A, Manolescu DC, Mader S** and Chiasson JL, données préliminaires publiées en *abstract* indexé (CJD 2015), manuscrit global en préparation pour soumission, possiblement avec le groupe *ELSEVIER*.

Respectant le règlement de la FESP, nous sommes les premiers auteurs de nos 3 publications chaque. Nous sommes aussi les deuxièmes co-auteurs de nos articles, soit M. Manolescu des trois articles de Mme. Sima et vice-versa Mme. Sima des articles No.1 et No.2 de M. Manolescu. Bien qu'orientés plus sur la souris (M. Manolescu) et plus chez l'humain (Mme. Sima), nous avons travaillé en commun, principalement sur les associations de la vitamine A (ROL-rétinol) et de son transporteur RBP4 ainsi que de l'acide rétinolique (AR) avec l'obésité, la résistance à l'insuline (RI) et le diabète de type 2 (T2DM).

Nos deux thèses se complètent ainsi harmonieusement. Celle sur la souris diabétiques de M. Manolescu s'inscrit comme **préambule** de la thèse de Mme. Sima, justifiant ses travaux chez l'humain. Celle de Mme. Sima s'inscrit comme **perspective concrétisée** de la thèse de M. Manolescu, confirmant chez l'humain ses résultats sur la souris. Les deux thèses préparent des futurs essais cliniques à l'AR sur l'obésité, la RI et le diabète T2DM.

Suite à la refonte du Règlement pédagogique de la FESP, entré en vigueur le 12 mai 2015, la Faculté de médecine a apporté, dans le cadre d'une politique facultaire, des précisions quant aux conditions et exigences de présentation des thèses soumis en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat de recherche. Ainsi, pour une thèse hybride, la Faculté de médecine exige du candidat au doctorat qu'il produise minimalement deux articles comme premier auteur ou co-premier auteur, dont au moins un doit être publié ou sinon accepté aux fins d'une publication. Un article signé par deux ou plusieurs co-premiers auteurs peut être soumis également, à condition que chacun des co-auteurs présente une justification détaillée, appuyée par les superviseurs, de leur contribution respective à la préparation de l'article. Cet article pourra être utilisé par chacun des deux étudiants dans le cadre de la thèse qu'ils soumettent, respectivement, en vue de l'obtention de leur grade de doctorat.

Nos deux thèses ci-haut mentionnées remplissent et dépassent déjà cette condition, ayant trois articles comme premier auteur chacune, dont deux articles publiés pour M. Manolescu et un publié pour Mme. Sima. De plus, les résultats préliminaires des trois autres articles (No.2 Manolescu et No.2 et 3 Sima A) sont aussi publiés dans des revues scientifiques avec comités des pairs, augurant bien pour la publication complète des manuscrits. Le chapitre 2 (publié) de la revue de littérature de M. Manolescu vient lui enrichir cette récolte globale. En tant que deuxièmes co-auteurs, nous avons également inclus réciproquement, dans les Annexes de nos thèses seulement, chacun les résumés des articles de l'autre. Premièrement pour permettre une vision globale de l'ampleur et de l'articulation de nos travaux et de nos thèses. Deuxièmement pour acquiescer explicitement nos droits d'auteur réciproques. Nous préservons également nos droits règlementaires de faire valoir nos statuts de co-auteurs - chacun pour les publications de l'autre - aux fins d'enrichissement de nos thèses, advenant que cela s'avérerait nécessaire (malgré tout) pour respecter le nombre minimal d'ouvrages pour nos graduations sans problèmes. En vous remerciant cordialement,

Daniel-Constantin Manolescu

Aurélia Sima

Prospective, partially demonstrated and other potential benefits to be investigated

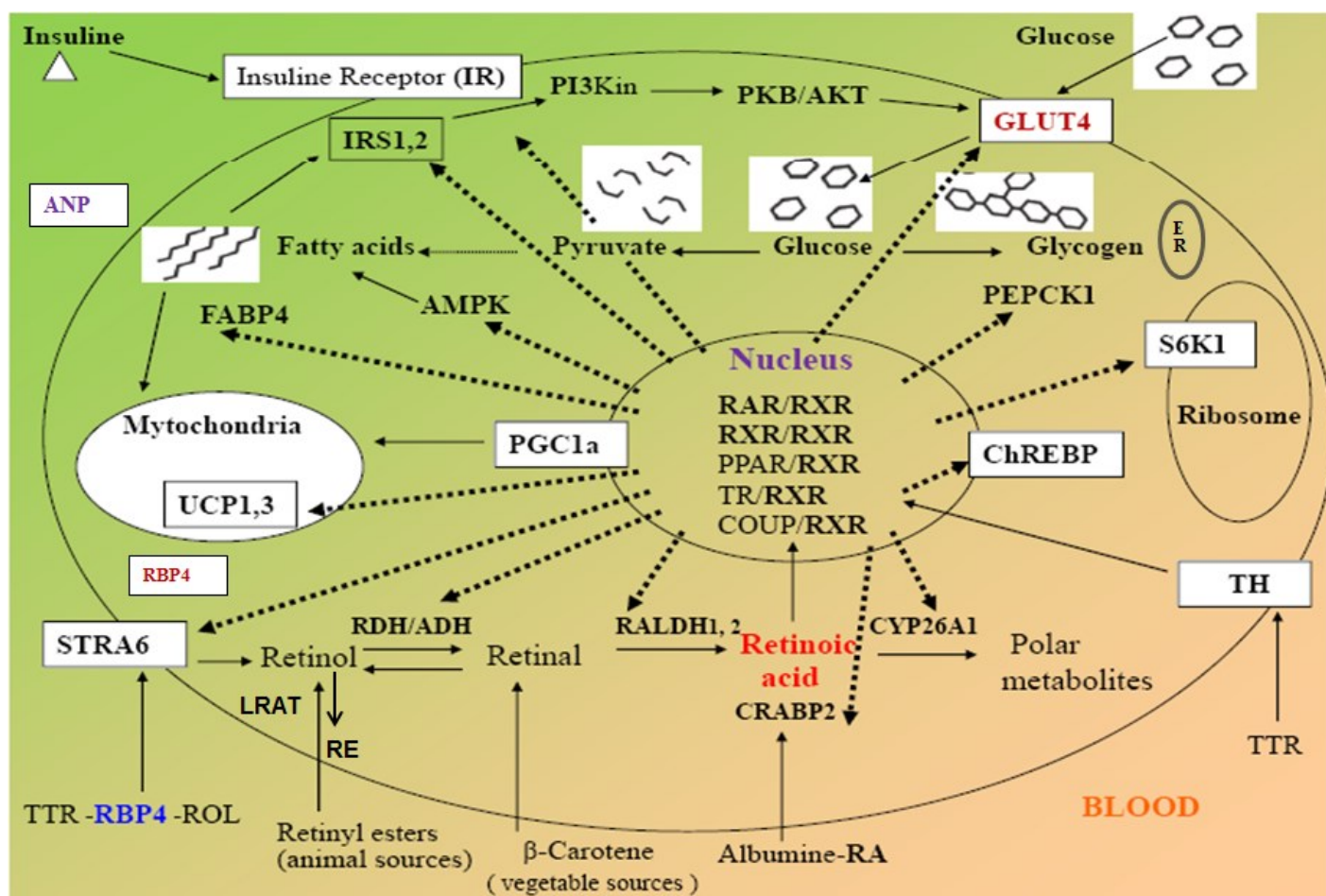


Fig.1 Potential RA impacts on genes from the metabolism of: retinoid, energy and insulin resistance, Manolescu DC 11.05.2010, 2012

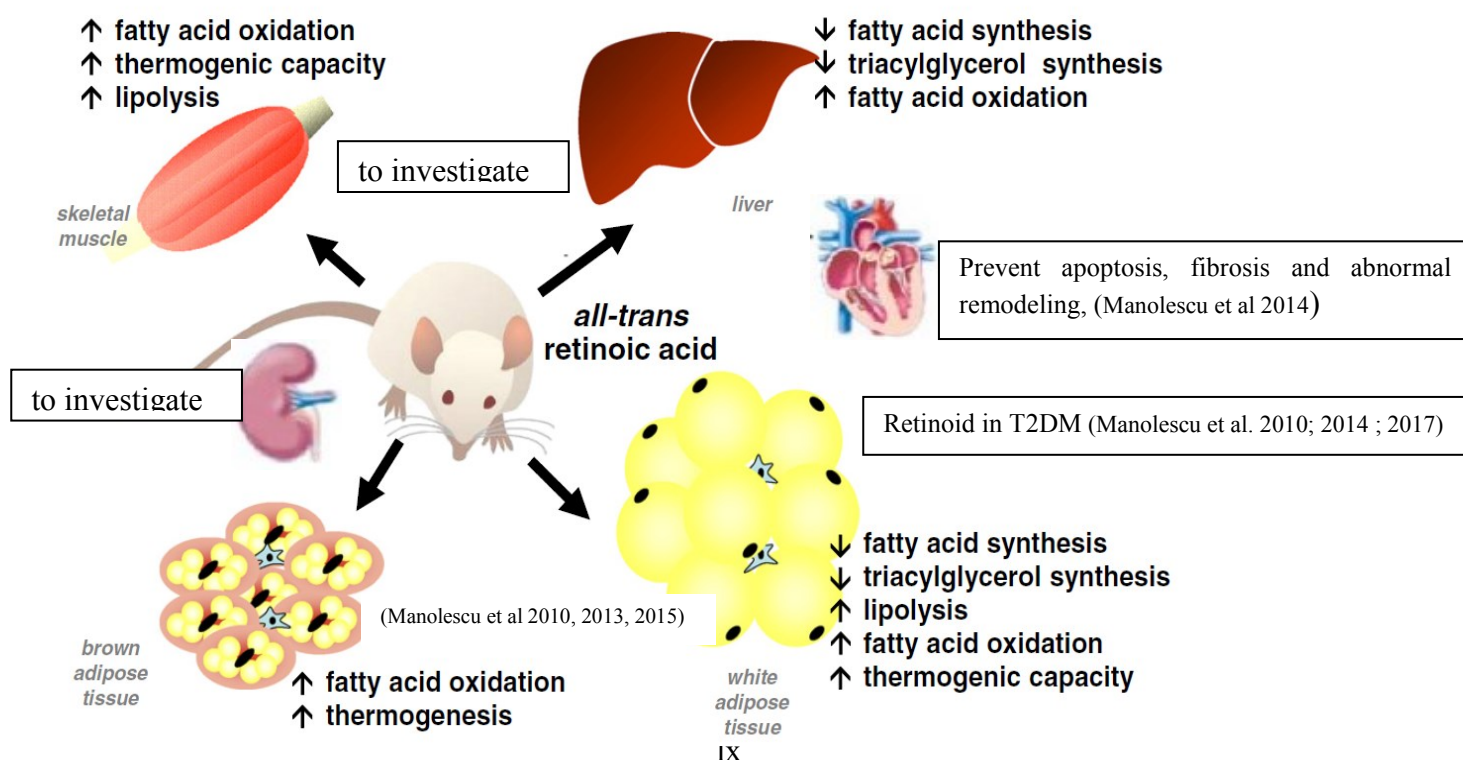


Fig.2 Adapted from Bonet L. et al. 2012, with expertise and approval of Dr. Bonet L /Dr. Palou A. Lab. Balear Islands, Spain



Santé

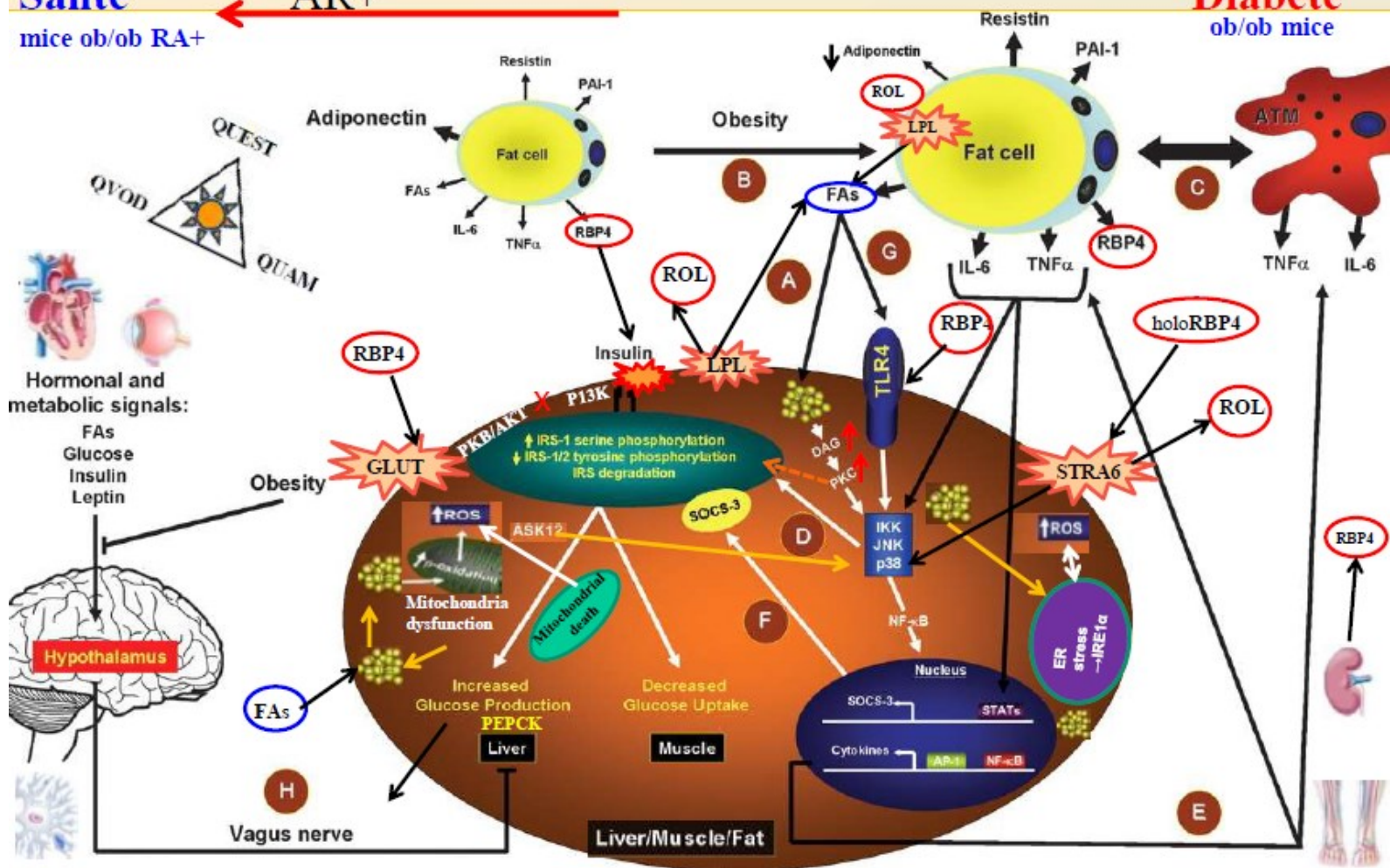
mice ob/ob RA+

From Obesity to Insulin Resistance and Diabetes

- endocrine, inflammatory and neuronal pathways -

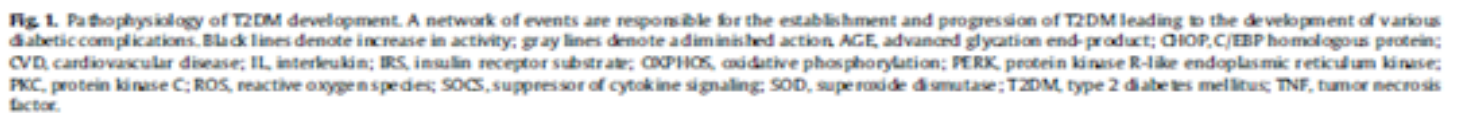
Diabète

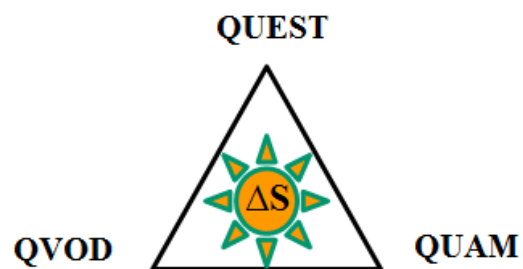
ob/ob mice



adapted from Qatanani M, Lazar M A Genes Dev. 2007;21:1443-1455

D.C.Manolescu., CRDM 27.Jan.2012

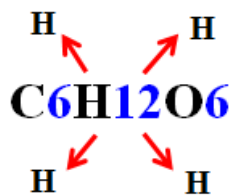
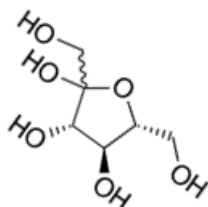
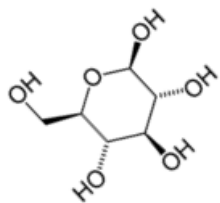




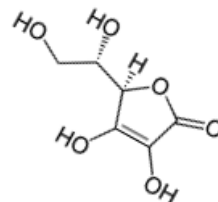
$$f = c_1x_1 + c_2x_2 + \dots c_nx_n$$

$$\min \quad f = \sum_{j=1}^n c_j x_j \quad \max$$

Objectif antidiabétique = Diminuer la glycémie avec **min** ΔS et **max** d'améliorations cardio-métaboliques



in vivo = ???



Perspectives 1: Projets de recherche fondamentale sur l'AR dans l'obésité et le diabète

a) « *Diet, food supplements, RA and intestinal microflora in obesity and diabetes* »- by Daniel-Constantin Manolescu and Aurelia Sima, 2017, **correspondent** Manolescu DC

- Full paper text
- In submission, according to our iterative protocol of exposure to peers
- Protected by Copy Right / Open citation agreed after publication

Note: This literature revue and a subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if mentioned.

b) « *Mitochondrial dynamics profiles and RA in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes* », by Daniel-Constantin Manolescu, 2017 **correspondent** Manolescu DC

- Sample extract text (one page shown only – the Abstract)
- In submission, according to our iterative protocol of exposure to peers
- Protected by Copy Right / Open citation agreed after publication

Note: This literature revue and a subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if mentioned.

c) « *Sirtuins and RA in obesity, insulin resistance, type 2 diabetes and age-related metabolism* » -by Daniel-Constantin Manolescu, 2017 **correspondent** Manolescu DC

- Sample extract text (one page shown only – the Abstract)
- In submission, according to our iterative protocol of exposure to peers
- Protected by Copy Right / Open citation agreed after publication

Note: This literature revue and a subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if mentioned.

Diet, food supplements, RA and intestinal microflora in obesity and diabetes

Daniel-Constantin **Manolescu**, MSc. PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)² and Aurelia **Sima**, MSc. PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)²

¹*Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, European Union.*

***Correspondence to:** Daniel-Constantin **Manolescu**^{1,2}

e-mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

Keywords: obesity, metabolic disorders, diabetes, intestinal microflora, gut biocenosis, gut microbiome, enterocyte, dysbiosis, dietary interventions, prebiotics, probiotics, probiotic-derived food supplements, retinoic acid, vitamin A.

Contributions: **Daniel-Constantin Manolescu** designed this review, performed the bibliographic research and wrote the paper. He also initiated and supervised the publication and the rayonnement procedures. Aurelia Sima contributed with information on pre-biotics.

Note: This literature revue and a subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if mentioned.

Abstract

Background: Obesity, insulin resistance and diabetes are closely-related metabolic disorders that have reached epidemic proportions. Recent studies revealed the implication of intestinal symbiotic microflora (gut microbiota, microbiome) in various metabolic diseases. Progress in microbial DNA sequencing, adapted to whole-genome sequencing technologies, now allows metagenomic DNA analysis to better explore the human gut microbiome. Affecting nutrient acquisition, energy harvest and many other metabolic pathways, the gut microbiota shows clear influence on the development of obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, immunity, intestinal and general health of their host. Many reports have shown clear interactions between nutrients and the microbiota, suggesting that high-fat/low-fiber western-style diet, dramatically affects the microbiome profile favouring the development of obesity and metabolic syndrome. We have already demonstrated an oral retinoic acid (RA) treatment in *ob/ob* mice, a model of obesity and diabetes, reduces serum vitamin A (ROL) and its transporter (RBP4), fasting glycaemia, insulin resistance (IR), body weight despite similar food intake (calories) and motor reflexes (Manolescu et al. 2010). We also found reduced adipocytes size, and decreased apoptosis and collagen accumulation in cardiomyocytes, suggesting prevention against the abnormal cardiac remodelling (Manolescu et al. 2014).

Scope of the review: Better understanding the variations in microbiota profiles with specific dietary or nutraceutical intake, and their subsequent metabolic outcomes, may help us to develop new preventive and therapeutic approaches. We now consider of interest to evaluate intestinal microflora of obese, IR and diabetic *ob/ob* mice, before and after our treatment with RA. A "favorably" shift in the intestinal microflora profile, after our RA treatment, would suggest the good effects of RA may also occur through "gut microbiota". We start here with a literature review on intestinal microbiota profiles in association with "favorable" and "unfavorable" cardio-metabolic characteristics. We also review scientific evidence that gut microbiota can play a role in the development of obesity and type 2-diabetes, together with dietary interventions on the intestinal microbiome as a preventive strategy.

Main conclusions: The biocenotic structure of gut microbiota (enterotype) can have either beneficial or deleterious effects. Food, nutraceuticals, drugs and other environmental intakes has an inter-crossed influence on the gut-microbiota and the host physiology and metabolism.

Mitochondrial dynamics and RA in obesity, insulin resistance and diabetes

by Daniel-Constantin **Manolescu**, MSc. PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)²

¹*Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, European Union.*

***Correspondence to:** Daniel-Constantin **Manolescu**^{1,2}

e-mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

Keywords: obesity, metabolic disorders, diabetes, oxidative stress, mitochondria dynamics, mitochondria morphology, mitochondrial fusion-fission, liver steatosis, NAFLD, retinoic acid, retinol, vitamin A.

Contributions: **Daniel-Constantin Manolescu** developed this reviews' concept and headlines, designed and performed the bibliographic research and wrote the paper. He also initiated, managed and supervised the publication and the rayonnement procedures.

Acknowledgement: Special thanks to Dr. Chantal Bemeur, Faculté de Médecine/Nutrition Université de Montréal, for her overviewing and suggestions on our initial text and concept.

Note: This literature revue and a subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if mentioned.

Copy right – Manolescu DC 2017

Abstract

Background: Mitochondria are key energy providers in eukaryotes cells, producing ATP by oxidation of glucose and fatty acids. They originally evolved from primitive bacteria. Establishing a successful symbiotic relationship, they ended up as organelles in the eukaryotic cells. As such, mitochondria possess specific DNA, with some different encoding sequences compared to the nuclear DNA, producing their structural proteins. Yet, major mitochondria's structure proteins are of nuclear DNA origin, translated on ribosomes and exported into mitochondria via cytosolic pathways. This journey might explain one of the most exciting aspects of their biology, the « *mitochondrial dynamics* ». That includes morphologic changes, such as fusion and fission, altering the mitochondrial network in response to environmental stimulations. This mitochondrial adaptive « *morphologic plasticity* » is controlled by mitochondria membrane-remodelling enzymes and other specific proteins. While mitochondria dynamics are clearly associated with mitochondrial bioenergetics functions, their mirror-and-contributor role in metabolic diseases is still unclear. Research evidence suggests mitochondrial dynamic is altered in obesity, insulin resistance and diabetes. We have already demonstrated an oral retinoic acid (RA) administration in ob/ob mice, a model of obesity, insulin resistance and hyperglycaemia, reduces serum vitamin A (ROL) and its transporter (RBP4), fasting glycaemia, insulin resistance (IR) and body weight, despite similar food intake (calories) and motor reflexes (Manolescu et al. 2010). These benefits were associated with reduced subcutaneous and visceral adipocytes size, and with decreased apoptosis and collagen accumulation in cardiomyocytes, suggesting preventive potential against abnormal cardiac remodelling (Manolescu et al. 2014).

Reviews' goal: Investigating the mitochondrial dynamics in health and metabolic diseases may help us to better understand them and maybe to discover new therapies. We now consider of interest, for our future experiments, to evaluate « *mitochondrial dynamics* » profiles in different tissues of obese, IR and diabetic ob/ob mice, before and after our treatment with RA. A "favorably" shifting in the « *mitochondrial dynamics* », after our RA treatment, would suggest the good effects of RA may also occur through it. This is a brief review of basic aspects in mitochondrial dynamics (fission and fusion), connecting mitochondrial morphology mainly with obesity, insulin resistance, diabetes, non-alcoholic hepatic steatosis (NASH) and fatty liver disease (NAFLD). Key implications of the vitamin A in mitochondrial functions and possible « *mitochondrial dynamics* », are briefly overviewed too.

Main conclusions: There is a dynamic relation between mitochondria morphology and function, in health and disease. Abnormal mitochondrial morphology is frequently seen in many pathologies including diabetes and complications. Mitochondrial morphology and functions, together with insulin sensitivity, can be improved upon specific interventions. A treatment with RA could be one of them.

Sirtuins and RA in obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, and age-related metabolism

by Daniel-Constantin **Manolescu**, MSc. PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)²

¹*Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, European Union.*

***Correspondence to:** Daniel-Constantin **Manolescu**^{1,2}
e-mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

Keywords: sirtuins, vitamin A, retinoic acid, energy, mitochondria, oxidative stress, obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, diabetes, inflammation, arthritis, aging.

Contributions: **Daniel-Constantin Manolescu** developed this reviews' concept and headlines, designed and performed the bibliographic research and wrote the paper. He also initiated, managed and supervised the publication and the rayonnement procedures.

Acknowledgement: Special thanks to Dr. Muhammad Zaffarullah, sirtuins expert, Faculté de Médecine, Université de Montréal, for his overviewing and suggestions on our initial text and concept.

Note: This literature revue and a subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if mentioned.

Copy right – Manolescu DC 2017

Abstract

Sirtuins (*sir2*) belong to a class of proteins (deacetylase enzymes), first discovered in 1984, exerting many intracellular functions involved with aging, transcription, apoptosis, inflammation, stress resistance, nutrition, energy efficiency, circadian clocks and mitochondrial biogenesis (Guarente L. 1999). The name *sir2* stands for « *silent mating-type information regulation 2* », and comes from yeasts (primitive eukaryote), but they are also present in bacteria, archaea and eukaryotes cellular signaling. Several Gram positive prokaryotes as well as the Gram negative hyperthermophilic bacteria *Thermotoga maritima*, also have sirtuins. Classic protein deacetylation simply hydrolyze acetyl-lysine residues, but sirtuins-mediated deacetylation joins lysine deacetylation to NAD hydrolysis. Dependence on NAD relates sirtuins enzymatic activity to cell energy status, via the cellular NAD: NADH ratio, the absolute levels of NAD, of NADH and of nicotinamide. Thus sirtuins are helpful to adapt the cellular physiology to nutritional and temporal (aging) changes challenging the energy metabolism.

Mammals have seven cellular sirtuin classes, located as following: SIRT1; 2-cytoplasm, SIRT1;2;6;7-nucleus, SIRT3;4;5-mitochondria. Several sirtuins are able to increase fat metabolism, tuning the mitochondrial respiration and energetic substrate intakes, to match cells energy production with their energetic needs, individually and for the whole organism. Research on sirtuins rocketed when the caloric restriction was found to extend rats life span (1,2) and natural flavonoids (e.g. resveratrol) to mimic caloric restriction outcomes in primitive bio-systems (6-7). It was suggested that sirtuins activation may be able to simulate some « caloric restriction type » favorable outcomes (3) or at least to delay some age-related metabolic diseases (4). All seven mammalian sirtuins were reported to be involved in metabolic diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular, arthritis and even dementia, often associated with aging (5,6). Mice overexpressing SIRT1 are very active and glucose tolerant, just as those on mild caloric restriction (7,8). They also resist better to gluco-lipo-toxicity and fatty liver (9, 10, 13). Mild caloric restriction and exercise increase SIRT1 activity (11) in association with higher expression (mRNA) of nuclear genes for mitochondrial proteins and energy expenditure (11,12,14).. By influencing the redox balance, the sirtuins may limit oxidative damage and apoptosis traditionally associated with aging, diabetes and other cardio-metabolic chronic diseases.

We have already demonstrated that an oral retinoic acid (RA) administration in ob/ob mice, a model of obesity, insulin resistance and hyperglycaemia, reduces serum vitamin A (ROL) and its transporter (RBP4), fasting glycaemia, insulin resistance (IR) and body weight, despite similar food intake (calories) and motor reflexes (Manolescu et al. 2010). These benefits were associated with reduced subcutaneous and visceral adipocytes size, and with decreased apoptosis and collagen accumulation in cardiomyocytes, suggesting preventive potential against abnormal cardiac remodelling (Manolescu et al. 2014). We now consider of interest, for our future experiments, to evaluate « *sirtuins profiles* » in different tissues of obese, IR and diabetic ob/ob mice, before and after treatment with RA. Specific variations in the « *sirtuins profiles* », after our RA treatment, would suggest that the metabolic benefits of RA may involve sirtuins activity as well.

Perspectives 2 : Projet vétérinaire et préclinique associé à l'AR, l'obésité et le diabète

«Optimising RA efficacy against obesity and insulin resistance in mice»

by Daniel-Constantin Manolescu, BSc.(ing)², MSc.¹ PhD.Cdt.¹ - *correspondent*

¹*Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, European U.*

***Correspondence to:** Daniel-Constantin **Manolescu**^{1,2}

e-mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

Keywords: obesity, insulin resistance, metabolic syndrome, diabetes, retinoid, RBP4, ROL, retinoic acid.

Contributions: Daniel-Constantin Manolescu developed this project, designed and performed the bibliographic research and wrote this proposal. He also secured partial funding for it.

Acknowledgement: Special thanks to Dr. P.V Bhat, retinoid expert, Faculté de Médecine, Université de Montréal, for his positive mentoring, overviewing and suggestions to improve our work. Kind regards to Ing. Aurelia Sima MSc, PhD. Cdt. for her patience and accuracy in reviewing our hypotheses and work. Kind regards to Dr. Muhammad Zaffarullah PhD, for overviewing our text and for his kind suggestions.

Note: This preclinical project prepares future trials with retinoid in obesity, insulin resistance and diabetes for veterinarian and human medicine. The literature revue and the subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if anything is mentioned by different reserchers.

BACKGROUND: Obesity is strongly associated with the development of insulin resistance (IR), metabolic syndrome and type 2 diabetes (1). Hyperglycemia develops when increased insulin secretion no longer compensates for the insulin resistance. Insulin regulates glucose homeostasis mainly by decreasing hepatic glucose output and by increasing the glucose uptake by skeletal muscles and adipose tissues. Skeletal muscles are dominant sites for the insulin-stimulated glucose uptake, after the translocation of the insulin-regulated glucose transporter (GLUT4) from the intracellular compartments to the cell surface (2). Only some of the blood glucose is taken by the fat tissues. Interestingly, the GLUT4 expression is diminished in adipocytes but not in skeletal muscles of obese and insulin resistant or type 2 diabetic animals and humans (2, 3). Serum retinol-binding protein-4 (RBP4), a hepatic protein whose well known function is the transport of retinol (ROL; vitamin A), was found to be increased in insulin resistance conditions. The association of RBP4 with the insulin resistance was highlighted by Yang et al. in 2005 (4), after using global gene expression analysis in epididymis fat tissue harbouring a primary genetic alteration in GLUT4 expression (mRNA). These authors observed that RBP4 expression levels (mRNA) were heightened by 2.3-fold in mice with adipocyte-specific silenced GLUT4-gene, whereas in GLUT4-overexpressed mice, the RBP4 expression levels were decreased by 54%, establishing an inverse relationship between GLUT4 and RBP4 expressions. When circulating RBP4 protein concentration was increased in mice, either by overexpressing it in fat tissues or by injecting it directly, then insulin resistance was induced. In parallel, knockout of the gene-encoding RBP4 enhanced insulin sensitivity compared to wild type mice. The absence of glucose uptake by adipocytes with diminished GLUT4 expression leads to higher RBP4 expression and its' release from adipocytes into the circulation. That is associated with insulin resistance, a decline in glucose uptake into skeletal muscles, and with increased glucose production by the liver. They proposed the adipose tissue can act as a glucose sensor and increased circulating RBP4 leads to IR (4).

RATIONALE: High concentration of serum RBP4 (e.g. from adipocytes and hepatic origin) contributes to systemic insulin resistance. Lowering serum RBP4 values enhances insulin sensitivity. This observation gives a rationale for new antidiabetic agents targeting to reduce serum RBP4 values. In our treatment on diabetes study, on obese and diabetic *ob/ob* mice, an *at*-RA dose of 100 µg/mouse/day, (2µg/gram body weight/day), in corn oil by stomach intubation, significantly reduced serum ROL and RBP4 concentrations and lowered insulin resistance and blood glucose (11). It appears that RA could be an effective antidiabetic agent and that RBP4, ROL and their ratio could serve as a diagnostic tool to assess the improvement of the glycaemic control. Our findings were noted by the *Lead-Discovery Magazine* GB (2010), as being of especial interest for drug development in metabolic and hormonal disorders. They were also noted in 2012 by Bonet and Palou team in an excellent review on the topic (12)

HYPOTHESIS: **1A)** Given the pleiotropic mechanisms of RA actions (genomic and non-genomic), even lower doses treatment (e.g. 50 µg/mouse/day or 1µg/gram body weight/day) may decrease insulin resistance in diabetic mice. **1B)** The 13-*cis* RA, a more stable isomer than *at*-RA may be efficient too. **2)** Our *at*RA treatment (11) may also prevent high fat diet obesity, IR and diabetes in normal mice. **3)** Possible mechanisms may involve genes from retinoid, brown fat and energy and insulin metabolism.

Perspectives 3 : Projets cliniques humains impliquant l'AR dans l'obésité et le diabète

« *Le potentiel de l'acide rétinoïque dans la prévention et le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 chez l'humain* » -Manolescu DC et Sima A. ; Bhat PV. et Chiasson J.L.

Reconnaissance par champs d'expertises et contributions :

MSc. **Manolescu Daniel Constantin**, PhD-Cdt., BSc. (Ing.) (boursier du FRQS et CIHR). **Volet biomarqueurs** : Variations du ROL et de la RBP4 circulants en contexte d'obésité, de résistance à l'insuline (RI) et de diabète de type 2. **Volet traitement** : Impact d'un traitement à l'acide rétinoïque dans l'obésité et RI. Parallèles et projections de la souris à humain.

MSc. **Sima Aurélie**, PhD-Cdt., BSc. (Ing.) (boursière Diabète Québec). **Volet prévention et biomarqueurs** : Implications du ROL et RBP4 dans le développement de la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose et le diabète de type 2 chez l'humain; observationnel.

Dr. **Chiasson Jean-Louis**, MD - Obésité, IR, Diabète, Endocrinologie; Clinique.

Dr. **Bhat Pangala V.** Ph. D – Métabolisme des rétinoïdes; maladies chroniques; fondamental.

Note 1: Les travaux et publications de Manolescu DC sur la souris ob/ob (Manolescu DC et al. 2010, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017) ont servi de base pour développer 2 projets cliniques- dont un observationnel- sur le ROL et la RBP4 dans l'obésité, la RI et le diabète de type 2, déjà concrétisé dans une **2e thèse** de doctorat et 2 publications (PhD.Cdt. **Aurélia Sima**) actuellement en soutenance. Contributions partagées de Daniel Constantin Manolescu et Aurélia Sima. Supervision par Dr. P.V. Bhat, Dr. Chiasson Jean-Louis, et Dr. Mader Sylvie.

Note 2: This project concerns future clinical trials with retinoid in obesity, insulin resistance and diabetes in humans. The literature revue and the subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if anything is mentioned by different scientific investigators.

1. Objectif général

L'objectif général de ces projets de recherche clinique est de procurer de nouvelles connaissances sur l'implication de la RBP4 et du rétinol (ROL) dans le développement et/ou le reflet de la résistance à l'insuline (IR), de l'intolérance au glucose et du diabète de type 2, et d'évaluer la capacité de la vitamine A sous forme d'acide rétinoïque (AR) à augmenter la sensibilité à l'insuline chez des sujets obèses et résistants à l'insuline.

2. Historique

- La graisse viscérale est un organe endocrinien qui synthétise et sécrète une série d'adipokines telles la protéine réactive, la leptine, la résistine, l'adiponectine et la TNF α , des cytokines qui sont impliquées dans la résistance à l'insuline. Une autre protéine, la RBP4 (« *retinol binding protein 4* ») a également été identifiée comme étant une autre adipokine sécrétée par le tissu adipeux viscéral.
- En 2005, l'équipe de Barbara Kahn et al. a démontré que la RBP4, qui transporte la vitamine A (ROL) dans le sang, était impliquée dans la résistance à l'insuline, un des facteurs majeurs impliqués dans le développement du diabète de type 2.
- Dans les modèles animaux d'obésité avec résistance à l'insuline, il a été observé que la RBP4 circulante était élevée. Un traitement avec la rosiglitazone, un sensibilisateur de l'insuline, diminuait la RBP4 ainsi que la RI. Toujours dans les modèles animaux, la surexpression de RBP4 était associée à une augmentation de la RI.
- Dans un modèle animal d'obésité et de diabète (souris *ob/ob*), nous avons démontré qu'un traitement avec de l'AR diminuait la RBP4 et le ROL circulants et que cela était associé à une baisse de la résistance à l'insuline et une diminution de la glycémie.
- Chez l'homme, quelques études ont démontré une corrélation entre la RBP4 et la résistance à l'insuline chez les sujets avec obésité et intolérance au glucose et chez ceux avec diabète de type 2. L'exercice était associé à une baisse de la RBP4 et à une augmentation de la sensibilité à l'insuline. De plus, le taux élevé de RBP4 était associé aux différentes composantes du syndrome métabolique. Toutefois, certains n'ont pas pu confirmer cette relation entre le taux de RBP4 et la résistance à l'insuline. Il a été suggéré que ces divergences étaient probablement dues à des problèmes méthodologiques. Plus de recherches sur le sujet s'avèrent donc nécessaires.
- Dans une étude préliminaire chez l'humain, nous avons démontré que la RBP4 et le ROL étaient très élevés chez des sujets obèses et avec diabète de type 2 mal contrôlés, par rapport à des sujets de poids normal et en santé (*Projet PhD Sima Aurélia*).

3. Raisonnement et hypothèse

Il existe un lien étroit entre la protéine RBP4, le ROL et le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 respectivement. Notre traitement à l'AR chez la souris obèse et diabétique *ob/ob* diminuait la RBP4 et le ROL sériques, leur ratio ROL: RBP4, la taille des adipocytes et le poids corporel, et améliorait la sensibilité à l'insuline et la glycémie. Nous émettons l'hypothèse qu'un traitement à l'AR. Nous émettons l'hypothèse qu'un traitement à l'AR adapté, aura le même effet chez des humains obèses, résistants à l'insuline et pré-diabétiques.

Vitamin A transporter RBP4 concentrations are specifically altered in obese and in type 2 diabetes patients' blood

Sima A et al. 2015, App. Physiology, Nutrition & Metab. 40(5):528(495-533)/05.2015

Aurélia Sima¹, Daniel-Constantin Manolescu¹ and Jean-Louis Chiasson¹¹CRCHUM Hôtel-Dieu, Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, CanadaPublished online 28 April 2015: <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0118>, CNS, Winnipeg, MN, Canada**Introduction**

Hepatic RBP4 (retinol binding protein) is the circulating vitamin A (ROL) carrier. The transthyretine (TTR) enhances ROL-RBP4 complex molecular weight, to prevent early kidney filtration and allow ROL to tissues. The RBP4 is also an adipokine, secreted by fat tissues. Exogenous administration of RBP4 induces insulin resistance (IR) in animals. Circulating RBP4 were found elevated in type 2 diabetes (T2DM) but their raise in obesity alone or in obesity and diabetes, together with their relation with TTR in these diseases are subjects of some controversy.

Hypothesis

We hypothesized that serum concentration of RBP4 and TTR may directly correlate with metabolic syndrome features and serve as pathophysiology indicators in obesity and diabetes.

Aims

The objective was to investigate the potential correlations of serum retinoid transporters RBP4 and TTR levels with traditional established markers in obesity, metabolic syndrome (MS) and T2DM.

Methods

Four groups of subjects (n=48) participated: Group A, healthy controls; Group B, obese diabetics with A1c > 7%; Group C, obese diabetics with A1c < 7%; Group D, obese non-diabetics. RBP4 and TTR were quantified by immune detections Western Blot and ELISA respectively. Biometry: (waist circumference-WC, weight, height, body mass index-BMI); Blood biochemistry: (insulin resistance-HOMA, glycated hemoglobin-A1C, triglycerides-TG, cholesterol-HDL; LDL, albumin/creatinine ratio-A/CR, uric acid, C-reactive proteins); Hematology and blood pressure.

Results

RA RBP4 were 2.58 ± 0.21 nmol/ml in healthy subjects, slightly increased in obese non-diabetics (3.81 ± 0.75), and markedly increased in obese diabetics, both well (5.92 ± 0.03) and poorly controlled (5.59 ± 0.22). RBP4 correlated directly with BMI, WC, IR-HOMA, TG and A/CR-ratio and inversely with HDL. No significant differences were found for TTR.

Conclusions

Serum levels of RBP4 but not the TTR are increased in obesity and diabetes and correlates with traditional biochemical and biometrical indicators of metabolic syndrome and diabetes. That should also influence the retinoid metabolism and homeostasis in these metabolic conditions. The RBP4, RBP4/TTR and other retinoid related molecules may show potential as pathophysiology indicators in these diseases.

Note: Aurelia Sima is a fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015. Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Project support: IRSC, CRCHUM. Student Support: Diabète Québec, NUT/FESP, CRCHUM, Prêts Gvt. Qc.



Retinoid and Related Molecules as Biomarkers in Obesity and Insulin Resistance – Sima A. et al
2015; Canadian Journal of Diabetes 39(2):171 /04.2015

A. Sima, D.-C. Manolescu, P.V. Bhat, J.-L. Chiasson, CRCHUM, Faculté Médecine/Nutrition, Université de Montréal

Available online 18 March 2015: <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2015.01.286>

Introduction

Adipose tissue remodeling in mammals is influenced by Retinoid (retinol (ROL), retinyl esters (RE), retinoic acid (RA). Visceral fat (VF) has stronger correlation with the metabolic syndrome (MS) and type 2 diabetes (T2DM) than subcutaneous fat (SF). Also, differences in retinoid metabolism between VF and SF are seen early in the MS. The RBP4 (retinol binding protein) the serum ROL carrier but also an adipokine, was shown to be in direct correlation with obesity and insulin resistance (IR).

Hypothesis

Changes in retinoid metabolism can serve as biomarkers in obese and diabetic persons.

Objective

Evaluate the potential of serum retinoid and related molecules (RBP4, ROL, etc.), as biological markers of MS and T2DM compared with traditional indicators of these diseases.

Methods

Four groups of subjects (n=48) participated in this study: Group A, healthy controls; Group B, obese diabetic patients with an A1C >7%; Group C, obese diabetic patients with an A1C <7%; Group D, obese non-diabetic individuals. RBP4 was measured by western blot/image-quantification and ROL by HPLC and were correlated with BMI, waist circumference (WC), lipid profile, A1C and albumin/creatinine ratio (ACR).

Results

RBP4 and ROL were 2.58 ± 0.21 and 2.94 ± 0.16 nmol/mL in healthy subjects, slightly increased in obese non-diabetic (3.81 ± 0.75 and 2.51 ± 0.41), and markedly increased in obese diabetic groups, both well (5.92 ± 0.03 and 3.76 ± 0.56) and poorly controlled (5.59 ± 0.22 and 4.28 ± 0.58). RBP4 and retinol correlated directly with BMI, WC, A1C, triglycerides and ACR and inversely with HDL.

Conclusions

Serum levels of RBP4 and retinol are increased in MS and T2DM and correlate with traditional biochemical markers and biometrical indicators of advanced obesity, insulin resistance and T2DM. Hence, retinoid and related molecules show potential as biological markers for obesity, insulin resistance and diabetes.

Note: Aurelia Sima is a fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015. Manolescu, D.C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Project support: IRSC, CRCHUM. Student Support: Diabète Québec, NUT/FESP, CRCHUM, Prêts Gvt. Qc.



Diabetes & Metabolism, Volume 39, Supplement 1, 26–29 March 2013, Page A100; Société Francophone du Diabète (SFD)

P2139 : Les Rétinoïdes Dans L'évaluation Précoce Du Syndrome Métabolique Et Diabète De Type 2 (Humain) Sima A et al 2013, Diabetes & Metabolism 39(1):A100/03.2013

A. Sima, D.-C. Manolescu, P.V. Bhat, J.-L. Chiasson, CRCHUM-Université de Montréal, Montréal, Canada

Available online 9 April 2013: [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(13\)72049-4](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(13)72049-4), Montpellier, France, UE

Abstract



Applied Physiology, Nutrition & Metabolism

Applied Physiology, Nutrition & Métabolisme, Volume 38, Issue 4, April 2013, Page 472, Canadian Nutrition Society (CNS)



The retinoid in early evaluation of metabolic syndrome and types 2 diabetes (human)

Sima A et al 2013, Applied Physiology, Nutrition & Metabolism 38(4):472(433-476)/04.2013

Aurélia Sima, Daniel-Constantin Manolescu, Jean-Louis Chiasson, and Pangala V. Bhat
CRCHUM Hôtel-Dieu, Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Accepted Sept.21, 2012, published online 22.April.2013: <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0099>, CNS, Québec, QC, Canada

Serum levels of RBP4 and ROL in obesity and type 2 diabetes in humans

Sima A et al 2012, Applied Physiology, Nutrition & Metabolism 37(5):589(565-598)/05.2012

Aurélia Sima, Daniel-Constantin Manolescu, Jean-Louis Chiasson and Pangala V. Bhat
CRCHUM, Lab. Nutrition et Cancer, Clinique de Recherche sur le Diabète, Fac. Médecine/Nutrition, Univ. de Montréal, QC, Canada.

published on line Mai.2012: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/h2012-046#>, CNS, Vancouver, BC, Canada

Introduction

RBP4, a protein known as serum Vit A (ROL) carrier as well as adipokine was noted for its role in insulin resistance. A study from our laboratory (*Manolescu et al. 2010, J. Nutr. 140:311*) shown the blood levels of RBP4 is higher in obese and diabetic mice (*ob/ob*) mice versus healthy lean controls. Serum ROL is greater in diabetic mice (*ob/ob*) versus control mice (*C57BL/6*). The ROL/RBP4 ratio was more than 1(one) for the diabetic animals (while theoretically is considered 1:1 for healthy animals)

Assumptions

We hypothesized that serum RBP4, ROL values, and the ratio of ROL/ RBP4 are disturbed in obese, even more so in obese-diabetic and are predictors for resistance to insulin, pre-diabetes, and type 2 diabetes.

Aims

Our objective was to measure the levels of RBP4 and vitamin A in serum and to estimate the IR in obese subjects and obese diabetic versus healthy lean subjects.

Methods

Clinical study on a group of 48 volunteers: n = 4 subgroups: A = control, thin (BMI < 25) and healthy; B = obese (BMI > 30) and diabetics non-controlled (HbA1C1 > 7); C = obese (BMI > 30) and diabetics controlled (HbA1C1 < 7); D = obese (BMI > 30) and nondiabetics. Anthropometric and biochemical profiles were established. Measures of RBP4 serum were done by WB and Image-Quant. Measurement of retinoid from the blood was done by HPLC.

Results

The blood levels of RBP4 gradually increase with obesity and insulin resistance: Gr.B (122.47 ± 4.72 ng/ μ L serum) > Gr.D (105.55 ± 2.81 ng/ μ L serum) > GR.A (55.54 ± 4.71 ng/ μ L serum). Association of RBP4 values: direct with BMI and triglycerides and inversely with HDL.

Conclusions

In conclusion, the blood levels of RBP4 are a good indicator of obesity and insulin resistance.

Note: Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship and Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012). Supported by: CIHR/IRSC, FRQS, CRCHUM, NUT/FESP-Université de Montréal, Prêts Gvt. Québec.

Circulating retinol binding protein (RBP4) is increased in obesity, insulin resistance and in type 2 diabetes mellitus

Aurélia Sima¹, Daniel-Constantin Manolescu¹, Sylvie Mader² and Jean-Louis Chiasson¹

¹*Research Group in Diabetes and Metabolism, Cardiometabolic axis, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu (CRCHUM); Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Immunology and Cancer Research Institute (IRIC); Department of Biochemistry, Université de Montréal, Québec, Canada*

Correspondence to: Sylvie Mader² and Jean-Louis Chiasson¹

Abstract

Introduction: Hepatic RBP4 (retinol binding protein) is released into the circulation bound to vitamin A (ROL) in equimolar ratio. Transthyretine (TTR) binds to ROL-RBP4 complex increasing its molecular weight and preventing early kidney filtration. RBP4 is also secreted by fat tissues as an adipokine. RBP4 has been shown to be increased in obese and insulin resistant mice. Circulating concentrations of RBP4 and TTR and their relations with obesity, insulin resistance (IR) metabolic syndrome (MS), and type 2 diabetes (T2DM) are still controversial in humans.

Hypothesis: Serum concentration of RBP4 and TTR are higher in obesity and involved in insulin resistance and T2DM development in humans.

Objective: The aim of this study was to evaluate the associations between circulating RBP4 and TTR, with obesity, IR, type 2 diabetes and other traditional risks factors of IR and T2DM in human subjects.

Methods: Four groups of subjects (n=60) were studied: Group A, lean healthy controls; Group B, obese poorly controlled diabetics (HbA1c > 7%); Group C obese well controlled diabetics (HbA1c < 7%); D-obese non-diabetic controls. The RBP4 and TTR were quantified by immunodetection and correlated with HOMA-IR as well as with waist circumference (WC), body mass index (BMI), fasting serum insulin and HOMA-B, fasting plasma glucose and HbA1C, triglycerides (TG), cholesterol (HDL, LDL), urinary albumin to creatinine ratio (A/CR), uric acid and hsCRP.

Results: RBP4 were $2.6 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ in healthy subjects, slightly increased in obese non-diabetics ($3.8 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$), and markedly increased in both well controlled ($5.1 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$) and poorly controlled obese diabetics ($5.3 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$). RBP4 correlated positively with insulin resistance and other traditional components of metabolic syndrome and diabetes (BMI, WC, IR-HOMA, TG and A/CR-ratio) and negatively with HDL. No differences in TTR levels between the 4 groups were found.

Conclusions: Circulating levels of RBP4 are higher in obesity and in T2DM, correlating with insulin resistance and other traditional components of the metabolic syndrome. These observations would support a role for RBP4 in the development of obesity, insulin resistance and T2DM in humans. RBP4 could be an interesting target for the development of new anti-diabetic drugs.

Keywords: RBP4, TTR, vitamin A metabolism, obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, type 2 diabetes

The relationship between circulating vitamin A (retinol) and insulin resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus

Aurélia Sima¹, Daniel-Constantin Manolescu¹, Sylvie Mader² and Jean-Louis Chiasson¹

¹Research Group in Diabetes and Metabolism, Cardiometabolic axis, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu (CRCHUM); Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada

²Immunology and Cancer Research Institute (IRIC); Department of Biochemistry, Université de Montréal, Québec, Canada

Correspondence to: Sylvie Mader²

Abstract

Introduction: In *ob/ob* mice, an animal model of obesity and hyperglycaemia, we have shown that serum vitamin A concentration is dramatically increased and that a retinoic acid (RA) treatment partially corrected it, while improving glucose tolerance.

Aim: The aim of the present study was to evaluate in human subjects, the relationship between circulating serum vitamin A (retinol) and obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (T2DM).

Hypothesis: ROL concentration in serum is influenced by insulin resistance and diabetes.

Methods: Four groups of subjects were studied: group A, lean healthy controls; group B, poorly-controlled obese diabetics (HbA1c >7%); group C, well-controlled obese diabetics (HbA1c < 7%); group D, obese non-diabetics controls (see article 2). Serum vitamin A levels were measured by HPLC and compared with classic markers of obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and T2DM.

Results: Serum ROL was similar in healthy subjects ($2.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) and obese non-diabetics ($1.9 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) but markedly increased in both well ($2.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) and poorly controlled ($3.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) obese diabetics. Serum ROL correlated directly with BMI, subcutaneous fat surface area, visceral adiposity index and waist circumference. Serum ROL also correlated positively with insulin resistance, fasting insulin, fasting plasma glucose, HbA1C, triglycerides, uric acid, and urinary albumin/creatinine ratio ACR and inversely with HDL cholesterol, all components of insulin resistance and type 2 diabetes.

Conclusions: Serum concentrations of ROL are higher in obese diabetic but not in obese non-diabetic subjects. Though ROL does correlate with most of the components of the metabolic syndrome, it does not seem to be directly involved in the development of early insulin resistance, but rather related with glucose intolerance and type 2 diabetes developments.

Keywords: liposoluble micronutrients, obesity, vitamins A, metabolic syndrome, insulin resistance, retinol, type 2 diabetes.

Perspectives 4 : Projet clinique humain impliquant l'AR dans l'obésité et le diabète

«Assessing RA efficacy against obesity and insulin resistance in humans »

by Daniel-Constantin Manolescu and Pangala V Bhat , correspondent Daniel-Constantin Manolescu

Daniel-Constantin Manolescu, MSc.¹ PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)²

¹Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada

²Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, European U.

***Correspondence to:** Daniel-Constantin **Manolescu**^{1,2}

e-mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

Keywords: obesity, insulin resistance, metabolic syndrome, diabetes, retinoid, RBP4, ROL, retinoic acid.

Contributions: From 2008 to 2015, Daniel-Constantin Manolescu and Pangala V Bhat together developed this project, designed and performed bibliographic research and wrote proposal versions. On his retirement in 2015, Dr. Pangala V. Bhat transferred full license, rights and disclosures to MSc. Daniel-Constantin Manolescu to further use and develop this project.

Acknowledgement: Special thanks to Dr. P.V Bhat, retinoid expert, Faculté de Médecine, Université de Montréal, for his positive mentoring, overviewing and suggestions to improve our work. Kind regards to Ing. Aurelia Sima MSc, PhD.Cdt., for her patience and accuracy in reviewing our hypotheses and work. Kind regards to Dr. Muhammad Zaffarullah PhD, for overviewing our text and for his kind suggestions.

Note 2: This project concerns future clinical trials with retinoid in obesity, insulin resistance and diabetes in humans. The literature revue and the subsequent project represents our protected intellectual property. As such, they must be cited accordingly if anything is mentioned by different scientific investigators.

RESEARCH PROPOSAL

Rationale and main objective: The main objective of this proposal is to examine the therapeutic value of retinoic acids (RAs) in the prevention and treatment of type 2 diabetes. Recent investigations have demonstrated that elevated serum retinol binding protein (RBP4) levels secreted from adipose tissue play a role in the development of systemic insulin resistance (IR) and lowering RBP4 levels improve insulin sensitivity. These observations provide a rationale for the development of new antidiabetic agents aimed at reducing serum RBP4 levels. We have recently shown in a pilot experiment (Manolescu et al.2010) that supplements of RAs significantly reduced serum retinol-RBP4 and glucose levels and suppressed insulin resistance in diabetic mice suggesting the possibility of utilizing RAs in the treatment of type 2 diabetes. In this proposal, we will extend our RA treatments study in humans with and without obesity, IR and type 2 diabetes.

SUMMARY

Insulin resistance is a fundamental cause of type 2 diabetes. While insulin action begins to decline, increased insulin secretion from β -cells compensates to decrease hyperglycemia. However, failure to do so eventually results in disease manifestation. In recent years, the role of adipose tissue, which secretes a number of adipokines implicated in the regulation of insulin action, has drawn attention and new therapeutic approaches targeting adipokines that improve insulin sensitivity are being investigated. One such adipokine, RBP4, has recently (2005) been demonstrated to be involved in insulin resistance. RBP4 was first isolated and characterized in 1968 and its only function recognized until 2005 was to transport retinol from the liver. The discovery that RBP4 had an additional role in controlling glucose homeostasis generated interest in the diabetic research community and resulted in more than 150 publications on the relationship between RBP4, insulin resistance, obesity and type 2 diabetes in experimental animals and humans (many of them are published in high impact journals) in the last four years. At present, several pharmaceutical companies have begun to develop antidiabetic agents that lower RBP4 in type 2 diabetes. The major challenge in producing RBP4-lowering drugs is that they should not lead to vitamin A deficiency or alter vitamin A metabolism because of decreased retinol transport. Our recent work demonstrated the RA lowers serum RBP4 and improves insulin sensitivity in insulin-resistant *ob/ob* mice indicating its potential use in the treatment of type 2 diabetes. Therefore, the present investigations in experimental diabetic (insulin-resistant) mice and proposed human studies should determine the utility of RAs as antidiabetic agents. The essential technical tools required to perform these experiments are available, intense work has been performed to confirm the hypothesis and the proposed studies are feasible to complete in a five-year period. The applicant has the necessary expertise (handling and dietary manipulations of animals, clinical research immersion, retinoid biology and metabolism and analytical techniques related to the proposal). The applicant also has the needed network partnership in research biochemistry, the study of glucose homeostasis in healthy and diabetic humans and with major interest in clinical trials looking-up at new drugs for the treatment of diabetes. Since RAs are being administered in cancer therapies and their side effects are well documented (91-94), their clinical value in type 2 diabetes in humans can be evaluated without a major risk. RAs are biologically active compounds and lowering RBP4 with them will not lead to vitamin A deficiency but may render additional benefits by inducing RA-dependent genes involved in insulin action.

« *Metabolomics nutritional data, mirrors of health and disease in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. What place for retinoids ?* » by **Daniel-Constantin Manolescu**,
correspondence to **Manolescu DC**

by Daniel-Constantin **Manolescu**, MSc. PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)²

¹*Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, European Union.*

***Correspondence to:** Daniel-Constantin **Manolescu**^{1,2}
e-mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

Keywords: nutritional metabolomics, metabonomics, biomarkers, metabolic profile and networks, modeling bioinformatics, systemic biology, Integrated Systemic Comparative Optimization, vitamin A, retinoic acid, obesity, insulin resistance, diabetes.

Contributions: **Daniel-Constantin Manolescu** developed this reviews' concept, designed and performed the bibliographic research and started the paper. Work is in progress!

Acknowledgement: Special thanks to Dr. Olivier Receveur, epidemiology expert, Faculté de Médecine, Université de Montréal, for his overviewing and suggestions on our initial concept.

Copy right – Manolescu DC 2017

« Metabolomics nutritional data, mirrors of health and disease in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. What place for retinoids? »

by Daniel-Constantin **Manolescu**, MSc. PhD.Cdt.¹, BSc.(ing)²

¹*Faculty of Medicine, Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

²*Faculty of Food Science and Engineering, Universitatea din Galati, România, Europe Union.*

Summary

Biosystems are complex multivariate cause-and-effect models. An intermediate phenotype (eg, proteins, histology) will reinforce a primary association between systemic phenotypes (eg physiology) and biomolecular information (eg tissue-specific gene expression). Causality, in health and in disease, must be evaluated beyond simple binary associations. In recent decades, new marriages have emerged in scientific research (between genomics, proteomics, metabolomics, bioinformatics) to better understand the relationship between nutrition and metabolism in the disease. Nutritional epidemiology and specific nutritional biomarkers in response to various diets and their physiological echoes are examples in this regard. Exploring various metabolite pools, in a broad and also in a targeted way, metabolomics can bring new information, integrating both biomolecular research and environmental actors (eg nutrition). The "functional" associations of "omics" (genomics, proteomics and / or metabolomics) with "health" and "disease" profiles are then put to use, both individually and integrated. Thus food metabolomics provides new tools for nutritional research on various metabolic disorders, such as obesity, insulin resistance and diabetes. Retinoids are important metabolic players.

Résumé

Les biosystèmes sont des modèles de cause à effet complexes et multivariés. Un phénotype intermédiaire (ex. protéines, histologie) va renforcer une association primaire entre des phénotypes systémiques (ex. physiologie) et de l'information biomoléculaire (ex. expressions géniques tissu-spécifiques). La causalité, dans la santé et dans la maladie, doit être évaluée au-delà des simples associations binaires. Au cours des dernières décennies, des nouveaux mariages ont émergé dans la recherche scientifique (entre la génomique, la protéomique, la métabolomique, la bioinformatique), pour mieux comprendre la relation nutrition-métabolisme dans la maladie. L'épidémiologie nutritionnelle et les biomarqueurs nutritionnels spécifiques, en réponse à des régimes alimentaires variés et à leurs échos physiologiques, sont des exemples en la matière. Explorant, autant de façon large que ciblée, divers pools de métabolites, la métabolomique peut apporter des nouvelles informations, intégrant à la fois la recherche biomoléculaire et les acteurs environnementaux (ex. la nutrition). Les associations « fonctionnelles » des « omics » (génomique, protéomique et/ou métabolomique) avec des profils « santé » et « maladie » sont ensuite mises à profit, autant sur un plan individuel qu'intégrés. La métabolomique alimentaire fournit ainsi de nouveaux outils pour la recherche nutritionnelle sur les divers troubles de métabolisme, comme l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète. Les rétinoïdes sont des acteurs importants du métabolisme.



UN DOCTORANT DE L'UDEM SE DÉMARQUE

par Éric Deguire, Mercredi 27.03.2013 , « *QUARTIER LIBRE* »

En février dernier, l'étudiant au doctorat en nutrition à l'UdeM Daniel-Constantin Manolescu a reçu la Médaille du jubilé de diamant de la reine Elizabeth II. Cette distinction honore des Canadiens issus de différents domaines qui ont contribué de façon remarquable au progrès de la société.

« Je suis particulièrement fier d'avoir remporté ce prix vu sa portée citoyenne, confie Daniel-Constantin Manolescu. Il y avait des candidats de tous les milieux, comme des musiciens et d'anciens militaires. » Le doctorant est déjà lauréat de plus de vingt-cinq prix et bourses pour son travail scientifique, mais la Médaille du jubilé de diamant de la reine Elizabeth II souligne aussi son engagement social.

« Je travaille pour assurer une bonne insertion sociale de la communauté roumaine de Montréal, affirme l'étudiant roumain qui a immigré au Québec en 1994. Ça m'a toujours tenu à cœur de promouvoir l'éducation et de prévenir le décrochage scolaire. » M. Manolescu est aussi membre bénévole du Centre des Sciences de Montréal et fait la promotion du français auprès de sa communauté.

La Médaille du jubilé de diamant, créée en 2012 afin de souligner le 60^e anniversaire de l'accession au trône de la reine Elizabeth II, a été décernée à 60 000 Canadiens qui œuvrent dans des champs d'activités différents. Ce sont justement les contributions citoyennes et scientifiques de M. Manolescu qui lui ont permis de recevoir cet honneur.

Selon M. Manolescu, la Médaille du jubilé de diamant de la reine Elizabeth II est complémentaire à la Médaille d'argent, qui lui a été remise par les Instituts de Recherche en Santé du Canada en 2012. « Cela a été un grand honneur de recevoir la Médaille d'argent, car la compétition réunissait des chercheurs de partout au Canada et nous devions passer devant deux jurys », explique le chercheur.

L'étudiant travaille sur le rôle des rétinoïdes – une substance de la famille de la vitamine A – dans le diabète de type 2 et l'obésité. Les expérimentations qu'il réalise pourront mener à de nouveaux traitements pour ces maladies. Son travail acharné lui a valu d'autres reconnaissances, comme la bourse d'excellence du Centre hospitalier de l'UdeM en 2011 et en 2012, ainsi que la bourse J.-A. De Sève en 2012.

Curieux et obstiné

« Daniel-Constantin est une personne très brillante. Il est autonome, méthodique et il connaît très bien son sujet » - affirme un de ses directeurs de thèse, Jean-Louis Chiasson - « Il adopte une approche très intéressante, qui pourrait permettre de développer de nouveaux

traitements ». Autre sa directrice de thèse, le Dr. Pangala V. Bhat, partage cet avis. « *C'est quelqu'un de très curieux et d'obstiné dans ses recherches. Il ne laisse jamais rien tomber* ».

Membre du comité de parrainage scientifique du Département de nutrition, Olivier Receveur suit M. Manolescu depuis ses études à la maîtrise : « *Je l'ai aidé à s'intégrer au Département. Son évolution et sa production sont remarquables, soutient M. Receveur. Son parcours n'a pas été facile, mais il a persévéré. Sa force de travail est époustouflante.* »

M. Receveur tient à souligner les qualités personnelles de Daniel- Constantin Manolescu. « *Nous avons tellement d'étudiants excellents et plusieurs méritent des prix, explique M. Receveur. Mais au-delà des qualités de chercheurs de Daniel-Constantin, c'est aussi ses qualités personnelles qui sont remarquables.* »

Un travailleur passionné

Alors qu'il était encore en Roumanie, M. Manolescu a obtenu un baccalauréat en science et technologie des aliments. « La biologie, c'est un fil conducteur dans ma vie et je m'y suis toujours intéressé, affirme-t-il. C'est, entre autres, par la nourriture que nous communiquons avec le monde extérieur. » L'étudiant au doctorat explique que les humains mangent toute sorte de molécules qui influencent même les gènes. « À très long terme ça peut aussi influencer l'évolution et on peut même voir apparaître de nouveaux organes », ajoute-t-il.

Aujourd'hui, la passion de M. Manolescu l'a mené à recevoir de nombreuses reconnaissances, mais il est toujours aussi dévoué. « *Quand on a quelque chose sous le microscope, on ne peut pas quitter le travail parce qu'il est 17 heures. On reste là, car notre cœur nous garde là* », ajoute-t-il.

M. Manolescu désire compléter son doctorat et a l'intention de poursuivre ses recherches au post-doctorat dans le but de mettre au point de nouveaux remèdes pour le diabète de type 2 et l'obésité.

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Vitamin A derivative could address type 2 diabetes and obesity – mice study

By Oliver Nieburg [↗](#)

16-Jun-2014 - Last updated on 17-Jun-2014 at 13:32 GMT

Vitamin A derivative retinoic acid could address obesity and type 2 diabetes and prevent their cardiovascular complications, according to a study by the University of Montreal and CHUM Research Centre.

The research, published in the journal of applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, studied the effect of daily retinoic acid treatment (two micrograms a day) on eight mice compared to a control group.



The mice received the retinoic acid dose in corn oil through stomach intubation for 16 days.

The researchers found that mice in the treatment group lost weight thus reducing visceral obesity, a risk factor for cardiovascular disease.

Obesity treatment

Commenting on the findings, study author Daniel-Constantin Manolescu, said: *"In obese and insulin resistant mice, retinoic acid reduces the risk of cardiac apoptosis [programmed cell death], stimulates the expression of cardio-protective genes reduced by the disease, and protects against the accumulation of collagen in the cardiac muscle, thus avoiding the occurrence of fibrosis and possible associated future complications."*

Earlier studies by the research team found that blood glucose, body weight and adipocyte size (fat cells) significantly decreased in treated mice, while physical activity and dietary intake were similar compared to the control group. "This suggests an increase in basal energy expenditure," said Manolescu.

The researchers added that the findings could lead to anti-diabetic and anti-obesity medicines with retinoids.

Source:

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism

DOI: 10.1139/apnm-2014-0005

"Natriuretic peptide and other cardio-protective genes are stimulated by Vitamin A (retinoid acid), preventing apoptosis and fibrosis in obese-diabetic mice heart"

Authors: Manolescu et al.

Study takes step towards a pill able to turn white fat into brown fat

Of course it won't provide the numerous health benefits of exercise, but researchers at the Harvard Stem Cell Institute (HSCI) have managed to turn white fat into brown fat, a step that could lead to easier weight management. Using human stem cells, the team generated a technique to screen for compounds that are able to achieve this important feat of fat colour transfer and have already identified two of these compounds. While it's not certain how the no-more-treadmill-pill would be concocted and whether it would be safe and effective, it's an important first step in the fight against obesity.



brazil
beauty
news

© 2014 - Brazil Beauty News
- www.brazilbeautynews.com

23. Dec. 2014

© Wallenrock / shutterstock.com

New discoveries in creating brown fat cells could make it a lot easier to get in shape for your next vacation. **For example, a study at the University of Montreal [1] identified retinoic acid-a derivative of Vitamin A-as being able to turn fat cells brown in mice,** but the Harvard team says their discovery is more significant. *"What we were really impressed by is that there are some compounds that have this same kind of effect when they are administered to animals, but when you remove them, the effect goes away,"* says Chad Cowan, a principal faculty member of HSCI. *"But what we saw here was a stable conversion."* Still, says Cowan, it's not certain what the long term effects on the metabolism and immune system could be, although he is encouraged by the success of the two compounds in mice. Brown fat is considered the "good fat" because unlike white fat, it's capable of generating heat by oxidizing fatty acid. To ignite this process, no exercise is necessary on the part of the individual, so brown fat cells increase the basal, or resting, metabolism. Researchers have come to believe that differing proportions of brown fat could explain why some eat more than others without gaining weight and without considerable exercise efforts. Other studies have indicated that it's possible to create brown fat in human participants by keeping their living environment at a cool 19 degrees C (66F) for a minimum of one month [2]. The HSCI study was published in the journal Nature Cell Biology. [3]

Foot notes

[1] "All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice," Daniel-Constantin Manolescu, Marek Jankowski, Bogdan A. Danalache, Donghao Wang, Tom L. Broderick, Jean-Louis Chiasson, Jolanta Gutkowski APNM/30.04.2014

[2] "Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans," Paul Lee, Sheila Smith, Joyce Linderman, Amber B Courville, Robert J Brychta, William Dieckmann, Charlotte D Werner, Kong Y Chen, Franc Diabetes/22.06.2014

[3] "White-to-brown metabolic conversion of human adipocytes by JAK inhibition", Moisan A, Lee Y, Zhang JD, Hudak C, Meyer CA, Prummer M, Zoffmann S, Truong HH, Ebeling M, Kialainen A, Gérard R, Xia F, Schinzel RT, Amrein K, Cowan NCBI/31.10.2014

<http://www.brazilbeautynews.com/study-takes-step-towards-a-pill-able-to-turn-466>

Vitamin A derivative could help treat type 2 diabetes

Thu, 19 Jun 2014

Recommend 0

Share



G+

Tweet



New **research** suggests a derivative of **Vitamin A** – retinoic acid – may have the potential to treat **type 2 diabetes** and protect against related **complications**.

The study, conducted by researchers from the University of Montreal and CHUM Research Centre (CRCHUM) in Canada, found that retinoic acid has a number of **anti-diabetic** effects in **obese** and **insulin** resistant mice.

"Retinoic acid reduces the risk of cardiac apoptosis [the process of programmed cell death], stimulates the expression of cardio-protective genes reduced by the disease, and protects against the accumulation of **collagen** in the cardiac muscle, thus avoiding the occurrence of fibrosis and possible associated future **complications**," Daniel-Constantin Manolescu, the study's first author, explained.

He added that this led to significant reductions in a number of type 2 **diabetes risk factors** - blood glucose, **insulin resistance**, **body weight** and **body fat**, including **visceral fat** - in retinoic acid treated animals who had the same dietary intake and physical activity as non-treated mice.

The findings follow on from previous research conducted by Manolescu and colleagues on the effects of retinoic acid on insulin resistance, diabetes and **obesity**, which found that the **Vitamin A** derivative increases **insulin sensitivity** in diabetic mice.

Diabetes.co.uk
PRESCRIPTION SERVICE

Get your NHS Repeat Prescriptions delivered free to your home or work.

REGISTER FREE



Jeans For Men

Shop Now>>

GAMISS

Vitamin A Derivative Might Treat Diabetes Type-2 and Obesity: Researchers

By Staff Reporter Jun 17, 2014 05:00 AM EDT

Retinoic acid (RA) - a derivative of Vitamin A - can help treat obesity and diabetes type-2, researchers say.

The study, conducted by researchers at the University of Montreal, found that the vitamin A derivative can stimulate the activity of genes that protect heart from diseases. The study was based on obese and insulin-resistant mice.

"Blood glucose, insulin resistance, body weight, and adipocyte size were significantly decreased in treated animals, including abdominal fat, while dietary intake and physical activity were similar for treated or non-treated animals. This suggests an increase in basal energy expenditure," said Daniel-Constantin Manolescu, first author of the study, in a [news release](#).

Researchers have found a possible mechanism that explains why retinoic acid helps treat obesity and diabetes type-2. They say that the secret is in [brown fat](#) - a type of fat that is involved in heat regulation and is mostly found in babies.

Vitamin A derivatives stimulate a mitochondrial uncoupling protein (UCP1), which changes the way energy is utilized in the body.

According to researchers, the effect of retinoic acid on metabolism can be seen in hibernating animals, which gain weight during spring months without developing diabetes. These animals don't move much in winter and still lose a lot of weight. Studies have shown that these animals store large amounts of Vitamin A in their liver.

Retinoic acid is also known for its role in cell differentiation and maturation and may play an important role in nudging pre-adipocytes to become brown instead of white fat cells. Other [scientists are looking for ways to increase brown fat in the body](#). Research has shown that brown fat helps people lose weight.

Researchers in the present study describe brown fat as "boilers" that "melt" reserves of white fat before it accumulates and causes problems.

"Our studies on animals show that retinoic acid induces normalization of blood glucose and reduction of obesity. It is an important contribution to understanding RA action on the liver, fat, muscles, and the heart, and on retinoid metabolism, energy metabolism, fatty acid oxidation, and insulin resistance. Our research identifies new metabolic effects of retinoids and may lead to anti-obesity and anti-diabetic medicines," said Dr. Jean-Louis Chiasson, one of the study authors.

The study findings were presented at the Annual Conference of the Canadian Nutrition Society in Saint John's, Newfoundland.

Email Newsletter

Enter your email and get it now! **SUBMIT**

Ad



Oplate Detox Treatment - Inpatient and Outpatient Care

Start Your Recovery Comfortably. Private & Intimate Treatment Center - Call Now!

promises.com

VI

EDITOR'S CHOICES



TECH
Japan to Send a Manned Mission to Moon by 2030



BIOLOGY
Localized Inflammation In The Brain Linked To Overeating, Obesity



SPACE
First Alien Moon Outside The Solar System Located Circling A Jupiter-Sized Exoplanet



HEALTH & MEDICINE
Loneliness: More Premature Deaths & Greater Health Risk Than Obesity, Study Shows

Take a Fit Test

Get your scores in games that challenge Memory, Attention, and more



Memory Matrix
55%



Speed Match
75%

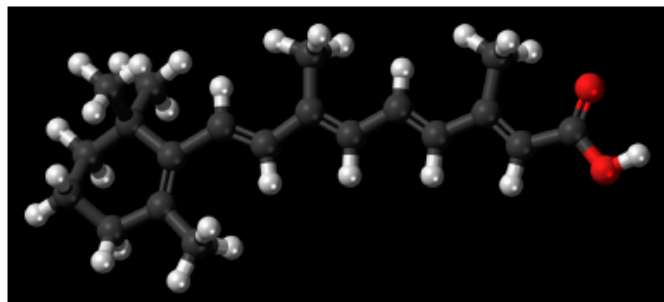


Train of Thought
30%

lumosity

Take Fit Test →

Acido retinoico per trattare il diabete di tipo 2 e impedire sue complicanze



I ricercatori dell' Università di Montreal e del Centro di Ricerca CHUM (CRCHUM) hanno recentemente dimostrato il potenziale dell' acido retinoico (RA), un derivato della vitamina A, nel trattamento dell' obesità e diabete di tipo 2 e nella prevenzione delle complicanze cardiovascolari.

I risultati sono stati presentati 6 giugno 2014 in occasione della Conferenza annuale della Canadian Nutrition Society a Saint John, Terranova.

"Nei topi obesi e diabetici, l' acido retinoico ha stimolato l'espressione di geni cardioprotettivi ridotti dalla malattia e protetto contro l'accumulo di collagene nel muscolo cardiaco, evitando così il verificarsi di fibrosi ed eventuali associate complicazioni future ", dice il primo autore dello studio, Daniel Constantin Manolescu. La scoperta segue un' altra ricerca condotta dal team sugli effetti dell' acido retinoico sull' insulino-resistenza, diabete e obesità. "il glucosio nel sangue, l' insulino-resistenza, il peso corporeo e la dimensione degli adipociti sono risultati significativamente diminuiti negli animali trattati, compreso il grasso addominale, mentre la dieta e l'attività fisica hanno dimostrato lo stesso effetto sia negli animali trattati che non trattati. Ciò suggerisce un aumento del dispendio energetico basale", spiega Manolescu.

Il grasso bianco è una riserva di energia costituita da un accumulo di grasso sotto forma di trigliceridi per soddisfare aumenti imprevisti di bisogni energetici, ma è anche un tessuto ormonale con un delicato equilibrio. Nel complesso, se l'assunzione di energia è maggiore di quella spesa per un periodo prolungato, l' obesità aumenta, mentre l'equilibrio ormonale e il metabolismo energetico sono disturbati. In questo contesto, il diabete di tipo 2 si sviluppa nel tempo.

"La vitamina A è un nutriente bioattivo. L'originalità del nostro progetto è di affrontare l'obesità e il diabete di tipo 2 attraverso il coinvolgimento dei retinoidi", dice il Dott. Pangala V. Bhat.

"I nostri studi su animali dimostrano che l'acido retinoico induce la normalizzazione della glicemia e la riduzione dell'obesità. Si tratta di un importante contributo alla comprensione delle azioni di RA sul fegato, grasso, muscoli e cuore e sul metabolismo dei retinoidi, il metabolismo energetico, ossidazione e insulino-resistenza. La nostra ricerca identifica nuovi effetti metabolici dei retinoidi e può portare a nuovi farmaci anti-obesità e farmaci anti-diabete ", conclude il Dott. Jean-Louis Chiasson.

Fonte **Natriuretic peptide and other cardio-protective genes are stimulated by Vitamin A (retinoid acid), preventing apoptosis and fibrosis in obese-diabetic mice heart** (<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/apnm-2014-0005>), (Manolescu et al., 2014). Collaboration between the laboratoires of Dr. Jean-Louis Chiasson and Dr. Jolanta Gutkowska, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, DOI: 10.1139/apnm-2014-0005, published 30 April 2014.

21 giugno 2014

Altri articoli su acido retinoico, diabete di tipo 2, obesità

- » Il diabete di tipo 2 ha origini epatiche (<https://www.medimagazine.it/diabete-tipo-2-origini-epatiche/>)
- » Obesità: variante genetica induce il corpo a memorizzare il grasso (<https://www.medimagazine.it/obesita-variante-genetica-induce-corpo-memorizzare-grasso/>)
- » Sia le donne obese che anoressiche hanno bassi livelli di allopregnanolone (<https://www.medimagazine.it/sia-le-donne-obese-anoressiche-bassi-livelli-neurosteroidi/>)
- » Diabete di tipo 2: nuovo trattamento per la insulino-resistenza (<https://www.medimagazine.it/diabete-di-tipo-2-nuovo-trattamento-per-la-insulino-resistenza/>)

Vitamin A derivative helps in treating obesity and type 2 diabetes

22/01/2018

Vitamin A Ringankan Penderita Diabetes dan Sakit Jantung - DuniaFitnes.com



Daniel-Constantin Manolescu, penulis pertama studi tersebut menegaskan bahwa pasein obesitas dan mengalami resistensi insulin, yang mengasup Vitamin A terbukti mengurangi risiko *cardiac apoptosis* (gangguan pembuluh darah), merangsang munculnya gen pelindung pembuluh darah, sekaligus mencegah akumulasi kolagen pada jaringan otot jantung, dan menurunkan risiko terjadinya fibrosis dan kemungkinan komplikasi di masa mendatang.

Manolescu mengatakan bahwa glukosa darah, resistensi insulin, berat badan, dan ukuran adiposit menurun secara bertahap pada tikus percobaan yang diberi asupan Vitamin A, termasuk pengurangan lemak di perut. Sedangkan tikus yang tidak diberi Vitamin A tidak menunjukkan perbaikan kondisi pada obesitas dan resistensi insulin mereka.

Dr Pangala V. Bhat mengatakan bahwa Vitamin A adalah nutrisi orisinil. Komponen bio-aktif Vitamin A terbukti ampuh mengurangi dampak buruk obesitas dan diabetes tipe 2 melalui keterlibatan retinoid. Studi ini telah menarik perhatian dunia internasional dan 12 tim di seluruh dunia telah dibentuk untuk membawa data konklusif mengenai temuan ini.

Temuan ini telah dipresentasikan dalam Konferensi Tahunan *Canadian Nutrition Society* di Saint John, Newfoundland. (dan)

BACA JUGA : BEBAS OSTEOARTHRITIS DENGAN JALAN KAKI 3.000 LANGKAH PERHARI (<http://duniafitnes.net/news/bebas-osteoarthritis-dengan-jalan-kaki-3-000-langkah-perhari.html>)

Two recent Canadian studies, one from Montreal and the other from Edmonton, reported on different vital functions of vitamin A.

The University of Montreal study found that vitamin A has a positive impact in reducing obesity and insulin resistance in type 2 diabetics. Researchers used a vitamin A supplement (retinoic acid derived from retinol) in diabetic animals. They discovered that the animals taking vitamin A had lower blood glucose levels and lost weight even though they ate the same amount of food as the others. The supplement was found to reduce fat cell size. It also improved energy metabolism, and protected the heart by reducing “cardiac fibrosis,” or thickening of the heart valves.

The University of Alberta study states that chronic alcohol consumption reduces the amount of vitamin A in the liver, which correlates with the severity of liver disease. Drinking alcohol daily also influences whole-body amounts of vitamin A. Alcohol actually breaks down vitamin A within the liver, and it alters expression of genes and proteins important for vitamin A metabolism in the body.

These two studies show that it may especially important to supplement with vitamin A if you're diabetic or drink alcohol daily. Eat vegetables like kale, sweet potatoes, spinach and carrots to get vitamin A.

(Daniel-Constantin Manolescu et al. “Positive impact of retinoid/vitamin A in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes,” Université de Montréal, Montréal, Québec & Robin Clugston et al., “Vitamin A and alcoholic liver disease: what's the link?” Department of Physiology, University of Alberta, Edmonton, delivered at the Canadian Nutrition Society: Scientific Abstracts from the 8th Annual Scientific Meeting
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/apnm-2017-0134>)

Annexes 2. Publications in folio du projet, attestations et reglementations

Note 1 : Vous trouverez ici une reprise complète des publications de notre thèse de doctorat *in-folio*, et diverses expertises que nous avons menées (ex : législation, méthodologiques, linguistiques).

En vous remerciant de votre aimable attention,

Daniel Constantin Manolescu- BSc. (Ing), MSc, PhD.



ELSEVIER

Language Editing Services

Registered Office:

Elsevier Ltd

The Boulevard, Langford Lane,

Kidlington, OX5 1GB, UK.

Registration No. 331566771

To whom it may concern

The paper "Metabolic and Therapeutic Impacts of Vitamin A as Retinoic Acid in Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes in Ob/Ob Mice" by Daniel Constantin Manolescu was edited by Elsevier Language Editing Services.

Kind regards,

Elsevier Webshop Support

Project nr:	127773
Project date:	18-Jan-2018
Completed:	25-Jan-2018
Edit using:	American English
Area of study:	Systems Biology
Project status:	Finished

You can supplement your perfectly language-edited paper with top quality illustrations! These can enhance the impact of your research by demonstrating concepts more clearly than using words alone. With WebShop's illustration services, you can get artistic support from Elsevier's professional illustrators for your scientific and medical research papers and presentations. Upload your drafted illustration, or even just an idea, and we'll send you a free quote within 24 business hours.

Please note: If you make alterations to a manuscript after we return it to you and this manuscript is rejected by a journal for English language errors, you cannot return it to us for free re-editing. However, if you do not alter a manuscript that we have edited and it is rejected by a journal on purely English language grounds, you can receive either a full refund or have your manuscript re-edited free of charge.

Positive impact of retinoid (vitamin A / retinoic acid) in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes- Manolescu DC et al. 2017, App. Physiology, Nutrition & Metab. 42(5):S31 (S1-S56)/05.2017

Daniel-Constantin Manolescu^{1,5}, Aurélie Sima^{1,5}, Sylvie Mader^{3,4} and Jean-Louis Chiasson^{2,5}

1-Department of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2-Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

3-Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

4-Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

5-Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Published on Web 09.May.2017: <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0134>, CNS, Montréal, QC, Canada

Introduction

Obesity and diabetes (T2DM) are associated with impaired metabolism of insulin, energy and vitamin A (ROL-retinol; RE-retinyl esters; RA-retinoic acid) and with cardiovascular diseases. Hepatic 'retinol binding protein' (RBP4) is the ROL equimolar transporter in serum. It is also secreted as an adipokine. Serum RBP4 is elevated in obesity and T2DM. Reducing serum RBP4, improves on insulin resistance (IR). Supplemental RA in rodents reduces serum ROL and variably influences body weight, IR and the heart. These impacts are still under investigation for better understanding.

Hypothesis

In a diabetic and obese animal model, a RA treatment will reduce serum ROL and RBP4, glycaemia, IR and body weight. These effects are associated with impacts on retinoid and energetic metabolism. A cardio-protective effect may occur too.

Aims

To evaluate in ob/ob mice (obese and diabetic) the RA impact on: A) serum and tissues levels of vitamin A and RBP4, glycaemia, IR and body weight; B) genes (mRNA) from vitamin A metabolism, energy metabolism and of the natriuretic peptides (ANP, BNP) cardio-protective system; C) adipose tissues and heart morphology.

Methods

Female Ob/Ob mice were treated with RA (2µg/gbw/d) for 16 days. Extractions RNA from: subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), skeletal muscle (SM), liver (LIV) and heart (HEA) Gene (mRNA/RTqPCR), proteins by Western Blot, vitamin A by HPLC, glycaemia, glucose and insulin tolerance test. Histology was done by tissues staining.

Results

Lower serum ROL, RBP4 and glucose concentrations, IR and body weight, but similar food intake, in RA treated versus untreated mice; Genes expression variations for: 1) tissues vitamin A metabolism; 2) energy (increased UCP1 and PGC1α); 3) increased ANP and BNP; Normalised RBP4 and vitamin A rate in tissues; Reductions in adipocytes sizes, heart fibrosis and apoptosis.

Conclusions

The RA treatment: 1) Decreases serum ROL and RBP4 concentrations, the glycaemia and the IR; 2) Reduces the mRNA of the RBP4 adipokine; 3) Modulates the vitamin A metabolism genes expression improving on its homeostasis; 4) Normalise the tissues RBP4 and vitamin A concentrations ; 5) Increases the UCP1 and PGC1α genes expression, a brown/beige fat signature; 6) Improves on energy metabolism reducing adipocytes size and body weight; 7) Induces an anti-fibrotic cardio-protective effect.

Note: Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Aurelie Sima is a fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015.

Publications *in-folio*

Article 1; publié dans « *The Journal of Nutrition* », ASN 2010

All-trans Retinoic Acid Lowers Serum RBP4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice

Daniel-Constantin Manolescu, Aurelia Sima, Pangala V. Bhat

The Journal of Nutrition, 140: 311-316; 03.2010

Historique de l'article

American Society of Nutrition publication statements:

- Manuscript received August 26, 2009
- Initial review completed October 4, 2009
- Revision accepted December 1, 2009
- First published online December 23, 2009

Authorship statements

« Daniel first PhD article was published early on during his graduate studies in the Journal of Nutrition (Manolescu et al 2010, JN 140:311-316) a leading journal in retinoid metabolism. He contributed to this work interactively on multiple levels beyond conducting the experiments. This included, research design, administrative management, literature review, interpretation and presentation of results, contribution to manuscript writing and responses to reviewers. The Acknowledgement in this paper means the work was performed under my supervision, and reflects the fact that, after team consultation, I took as the lab director the major design and manuscript decisions, as is common when training a graduate student. This does not detract in any way from Daniel's assiduous work in the lab and animal facility since already 2008, his initiative, critical thinking and intellectual contribution to the quality of the study. I have indeed acknowledged Daniel's important contributions by assigning him the legitimate right to include this paper in his PhD thesis as a published article. In conclusion I hope that this letter will lift any doubt and I am highly supportive of his candidacy for the grade of PhD Nutrition /Medicine »

Pangala V. Bhat PhD- Professor Titulaire, Medecine/Nutrition, Université de Montréal (retired 2015)

All-trans Retinoic Acid Lowers Serum Retinol-Binding Protein 4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice¹⁻³

Daniel-Constantin Manolescu, Aurelia Sima, and Pangala V. Bhat*

Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal-Hôtel-Dieu; and Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, H2W 1T7, Canada

Abstract

Recent investigations have demonstrated that elevated serum retinol-binding protein 4 (RBP4) secreted from adipose tissue plays a role in the development of systemic insulin resistance, and lowering RBP4 improves insulin sensitivity. These observations provide a rationale for the development of new antidiabetic agents aimed at reducing serum RBP4 concentrations. In this study, we sought to determine whether retinoic acid (RA) administration decreases serum RBP4 and suppresses insulin resistance in diabetic *ob/ob* mice. All-trans RA [100 µg/(mouse·d) in corn oil] was administered by stomach intubation to a group of *ob/ob* mice, with the control group receiving the vehicle for 16 d. Body weight and food intake were monitored. Glucose and insulin tolerance tests were performed. We quantified serum RBP4 and retinol by Western blotting and HPLC, respectively. RA treatment reduced body weight ($P < 0.05$), basal serum glucose ($P < 0.001$), serum retinol ($P < 0.01$), and RBP4 ($P < 0.05$). It improved insulin sensitivity and decreased the retinol:RBP4 ratio ($P < 0.05$). These studies suggest that RA is an effective antidiabetic agent that could be considered in the treatment of type 2 diabetes. J. Nutr. 140: 311–316, 2010.

Introduction

All-trans retinoic acid (RA),⁴ the active metabolite of vitamin A, is essential for embryogenesis and the proper maintenance of epithelial structure (1,2). Many biological functions of RA are mediated by RA receptors (RAR and RXR) (3). RA is also a powerful chemopreventive agent (4). Clinical investigations have demonstrated that it elicits complete remission in patients with acute promyelocytic leukemia (4,5). RA is also currently administered for the treatment of prostate cancer or neuroblastoma, and various other RA forms (retinoids) represent chemopreventive approaches in patients with premalignant lesions such as actinic keratinosis, leukoplakia, and cervical dysplasia, or after therapy of primary skin, oral, lung, and breast cancers (6,7). Although RA is a promising anticancer drug, its efficacy against other diseases, such as diabetes, has not been explored.

Retinol-binding protein 4 (RBP4), a 21-kDa protein, is a physiological carrier of retinol in the circulation (8). The liver is

the major site where RBP4 is synthesized and retinol is mobilized from hepatic vitamin A storage depots bound to newly synthesized RBP4 in a 1:1 molar ratio (9,10). In the circulation, RBP4 exists as a protein complex with the higher molecular weight protein transthyretin (TTR), which prevents glomerular filtration and reduces renal clearance (11). In addition to the liver, other organs and tissues also express RBP4 (12). Recent investigations have demonstrated that serum RBP4 is increased in insulin-resistant mice and agents that lower RBP4 improve insulin sensitivity (13). Serum RBP4 concentrations correlate with the magnitude of insulin resistance in participants with obesity, impaired glucose tolerance, or type 2 diabetes and in nondiabetic participants with a strong family history of type 2 diabetes (14). In addition, elevated serum RBP4 is associated with metabolic syndrome components, such as increased BMI, waist-to-hip ratio, serum triglyceride concentrations, and systolic blood pressure. Interestingly, exercise training is accompanied by a reduction in serum RBP4 concentrations only in participants with improved insulin resistance. Recently, extensive trials in insulin-resistant adults and children from multiple ethnic backgrounds discerned strong links between serum RBP4 concentrations and insulin resistance and secretion, obesity, and metabolic syndrome components (15–18). In addition, interventions that ameliorate insulin resistance in humans lower serum RBP4 (19–21). Genetic modifications in RBP4 are also associated with heightened risk of type 2 diabetes (22,23). All these findings provide a rationale for antidiabetic therapies aimed at reducing serum RBP4 concentrations. However, a few

¹ Supported by a grant from Canadian Institute of Health Research.

² Author disclosures: P. V. Bhat, D. Manolescu, and A. Sima, no conflicts of interest.

³ Supplemental Figure 1 is available with the online posting of this paper at jn.nutrition.org.

⁴ Abbreviations used: AUC, area under the curve; IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test; IPITT, intraperitoneal insulin tolerance test; RA, retinoic acid; RA[−], control group; RA⁺, retinoic acid-supplemented group; RBP4, retinol-binding protein 4; RAR, retinoic acid receptor; TTR, transthyretin.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: pangala.v.bhat@umontreal.ca.

studies have not found a correlation between insulin resistance and serum RBP4 (24–27), which has been attributed to methodological problems (28).

We and others have shown that dietary RA dramatically depresses circulating retinol levels in rodents (29–31). Although RBP4 was not measured in these studies, its levels might have been diminished, because retinol was bound to RBP4 in serum. Because RA has retinol-RBP4-lowering effects, we hypothesized that the treatment of diabetic mice with RA may result in the suppression of insulin resistance.

Materials and Methods

Mice. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Montreal Research Centre. Sixteen female 9-wk-old B6.V-Lep^J *ob/ob* mice were obtained from Jackson Laboratory. They were divided into 2 groups of 8 mice each: 1 control (RA⁻) and 1 RA-supplemented (RA⁺). The mice were housed (4 per cage) under environmentally controlled conditions and a 12-h-light/dark cycle with free access to water and standard rodent pellet diet (no. 2018, 18% protein for rodents, Harlan Teklad). The composition of the diet was (g/kg): crude protein, 188; crude oil, 60 (total saturated, 9.6; total monounsaturated, 12.8; and total polyunsaturated, 34.1), crude fiber, 38; carbohydrates, 500 (starch, 450; and sugar, 50), mineral mix, 32.05; vitamin mix, 2.9; and energy, 13.7 kJ/g. They were acclimatized to their new environment for 1 wk before the experiment started. Body weight and food intake were measured daily.

Ten-week-old lean mice (C57BL/6 strain), obtained from Charles River Labs and fed standard rodent pellet diet, were studied to determine the normal levels of RBP4, retinol, and their ratios.

RA preparation and administration. All-*trans* RA (Sigma-Aldrich) was dissolved in corn oil and delivered at a dose of 100 μ g in 100 μ L to the mice by stomach intubation daily in the morning. RA⁻ mice received only the vehicle, corn oil. RA supplementation continued for 16 d. Because RA is a relatively unstable compound, the solution was prepared daily and stability was verified by HPLC. To avoid possible RA breakdown from light exposure, all operations with RA were undertaken in dim light.

Measurement of blood glucose, intraperitoneal glucose, and insulin tolerance tests. Mice were deprived of food for 4 h and blood glucose concentrations were measured in tail blood samples on d 9 (during treatment) and d 16 (last day of treatment) when intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (IPGTT and IPITT) were performed. For IPGTT and IPITT, the mice received injections of glucose (1 g/kg body weight) and human regular insulin (1 IU/kg body weight), respectively. Blood glucose concentrations were quantified by Accu-Check glucometer (Roche) from tail blood samples at 0, 20, 40, 60, 90, and 120 min after glucose and insulin administration.

Collection and storage of serum samples. After mice were deprived of feed overnight, blood was collected into vacutainer tubes containing a silica gel-based clotting activator and previously wrapped with aluminum foil to minimize light exposure. The samples were immediately processed in a dark room and serum was obtained by centrifugation at $8165 \times g$ at 4°C (Eppendorf Centrifuge, model 5415C), then stored in 1.5-mL brown Eppendorf cryotubes at -80°C until analysis. They were thawed once and simultaneously assayed for retinol and RBP4.

Extraction of retinol from serum samples for HPLC. Retinol from the serum samples was extracted by butanol/acetonitrile (equal volumes) essentially as described by McClean et al. (32), except that the method was applied to smaller sample volumes. Samples stored at -80°C were defrosted on ice and centrifuged for 10 min at 4°C at $735 \times g$ (Eppendorf Centrifuge, model 5415C) to obtain clear supernatants. Then 200 μ L of serum was transferred to a borosilicate tube wrapped in aluminum foil and 200 μ L of butanol/acetonitrile (1:1) was added. The mixture was vortexed for 1 min and, after the addition of 72 mg hydrated K₂PO₄ in

20 μ L of water, was vortexed again for 30 s. The extraction mixture was centrifuged at $2620 \times g$ for 15 min in a Sorval RC3C Plus centrifuge precooled to 4°C. A total of 100 μ L of clear supernatant was injected into the HPLC system. Recovery studies were performed with the addition of retinoids (5–50 ng in 100 μ L) to 3 separate serum samples. Retinol recovery in this extraction method is >99%.

HPLC of serum retinol. The HPLC system consisted of Shimadzu model LC-10ADVP equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system (Man-Tech). Retinol was separated on a Partisil 10-ODS analytical column (250 \times 4.5 mm, Grace Discovery Sciences) and eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (65:35), containing 10 mmol/L ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 mL/min. Retinol was detected by a photodiode array detector (Shimadzu model SPD-M10 AVP) that collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for retinol were obtained with standard pure solutions of retinol (Sigma-Aldrich). Characteristic UV spectra and retention times were identified for retinol and peak areas were measured at λ_{\max} 330 in a Shimadzu model SZ-228 data system. The detection limit for retinol was 2 pg.

Measurement of serum RBP4 by quantitative Western blotting. Serum RBP4 was quantified essentially as described by Graham et al. (28). Pure human urinary RBP4 (Sigma-Aldrich) served as standard protein for RBP4 quantification. Standard solutions of 20, 40, and 80 ng/ μ L of RBP4 and 1- μ L serum samples were used in the analysis. Proteins were separated on 15% Tris-glycine SDS-PAGE gels and were transferred to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham). The blots were incubated overnight at 4°C with primary antibody, anti-RBP4 raised against full-length human RBP4 that is recommended for the detection of precursor and mature mouse, rat, and human RBP4 (Santa Cruz Biotechnology). The primary antibody was diluted 1:700. The blots were subsequently incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase, diluted 1:3,000, Santa Cruz Biotechnology). Antibody complexes were visualized by enzymatic chemiluminescence (chemosubstrate kit from Perkin Elmer) and the bands were quantified with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics). Standard RBP4 calibration curves (second-order polynomial curves, $r^2 > 0.99$) for each individual gel were charted to calculate its concentrations in serum.

Statistical analysis. The results are presented as mean \pm SEM. Significance was assessed by 1-way ANOVA followed by Newman-Keuls analysis (Prism Graph Pad software). An unpaired Student's *t* test was used for comparison of area under the curve (AUC)_{glucose} and AUC_{insulin}. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

RA supplementation reduces body weight. Mice began to lose weight 2 d after RA administration (Fig. 1) and continued to do so for 13 d, after which they gradually started to gain weight

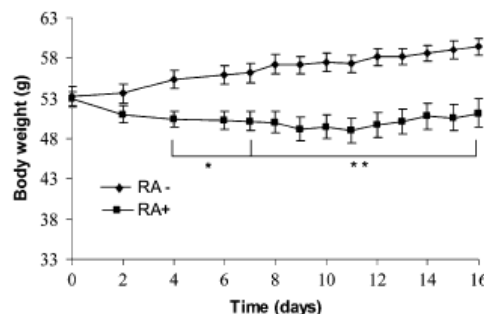


FIGURE 1 Growth curves of RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice during the 16-d treatment. Values are mean \pm SEM, $n = 7$ –8. Asterisks indicate different from RA⁻ at that time: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

at a low rate. On the other hand, mice in the RA⁻ group grew normally and gained weight during the course of the experiment. Body weights of the RA⁺ mice were less than those of the RA⁻ mice, beginning on d 4 of the study ($P < 0.05$) (Fig. 1). On d 16, RA⁺ mice weighed 7.4% less than RA⁻ controls ($P < 0.01$). The lower weight was not due to reduced food intake, which did not differ between RA⁻ [5.43 ± 0.14 g/(mouse·d)] and RA⁺ (5.17 ± 0.13 g/(mouse·d)) groups.

RA supplementation lowers basal blood glucose concentrations, improves glucose tolerance, and suppresses insulin resistance. Blood glucose concentrations after 4-h food removal in *ob/ob* mice were measured on d 9 and 16 after daily administration of RA or vehicle. RA treatment decreased basal blood glucose ($P < 0.001$) on d 9 and 16 (Fig. 2). The blood glucose-lowering effect of RA was dramatic, with concentrations in the RA⁺ group being ~45% less than in RA⁻ mice at both times. Glucose tolerance was evaluated in RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice by IPGTT and significant improvement was observed in the RA⁺ group (Fig. 3A). The difference in the AUC of blood glucose between RA⁻ and RA⁺ mice was 20% ($P < 0.01$). To assess the amelioration of insulin sensitivity by RA, we performed IPITT and measured glucose excursion in response to insulin. RA treatment resulted in decreased blood glucose concentrations at 20–60 min (Fig. 3B), indicating significant suppression of insulin resistance. The difference in the AUC of blood glucose between RA⁻ and RA⁺ mice was 34% ($P < 0.05$).

RA treatment lowers circulating retinol and RBP4 concentrations and the retinol:RBP4 ratio. It has been demonstrated that RA supplements in the diet lower serum retinol concentrations in rats. Therefore, it was of interest to determine whether RA treatment alters serum retinol and RBP4 concentrations in *ob/ob* mice. Supplemental Figure 1 illustrates HPLC separation of retinol extracted from the serum of RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice and lean controls. RA⁺ *ob/ob* mice had a 29% lower serum retinol concentration than RA⁻ mice (4.2 ± 0.40 vs. 5.9 ± 0.34 $\mu\text{mol/L}$, respectively; $P < 0.01$). However, RA treatment for 16 d did not normalize the serum retinol concentration of *ob/ob* mice; it was lower in lean mice (1.9 ± 0.14 $\mu\text{mol/L}$) than in both *ob/ob* groups ($P < 0.001$). Serum RBP4 concentrations were analyzed by quantitative Western blotting. Figure 4A depicts representative Western blots of RBP4 from RA⁻, RA⁺ *ob/ob*, and lean mice along with standard pure RBP4. RA treatment reduced serum RBP4 concentrations in *ob/ob* mice (13%; $P < 0.05$) (Fig. 4B), in good agreement with improved insulin sensitivity (Fig. 3).

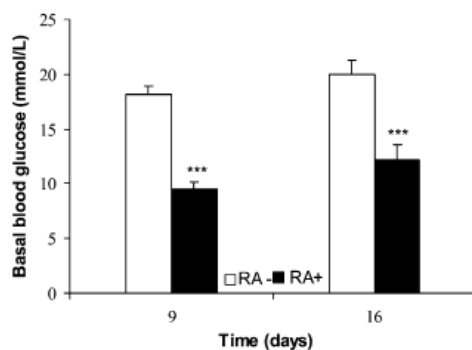


FIGURE 2 Basal blood glucose concentrations in RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice on d 9 and 16. Values are mean \pm SEM, $n = 6$ –8. ***Different from RA⁻ at that time, $P < 0.001$.

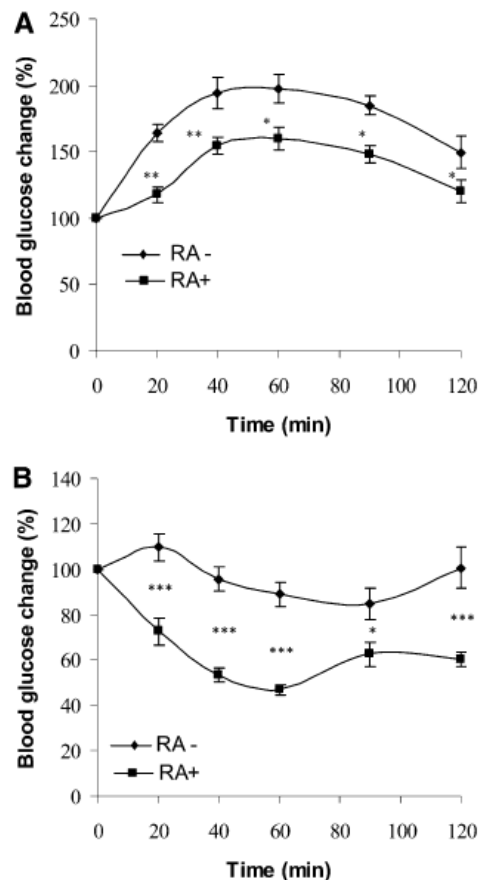


FIGURE 3 IPGTT (A) and IPITT (B) in RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice on d 15 and 16, respectively ($n = 5$ –8). Glucose concentrations were normalized to the time zero concentration of the RA⁻ group and plotted as % change overtime. Values are mean \pm SEM, $n = 5$ –8. Asterisks indicate different from RA⁻ at that time: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Although RA significantly decreased serum RBP4 concentrations, they still differed from those of lean mice (Fig. 4B, c). The *ob/ob* mice had a serum retinol:RBP4 ratio of 2.4 ± 0.14 ($P < 0.01$) (Fig. 4C, a), higher than that of lean mice (1.38 ± 0.07 ; $P < 0.01$) (Fig. 4C, c). RA treatment reduced the retinol:RBP4 ratio in *ob/ob* mice (1.97 ± 0.12) (13%; $P < 0.05$) but did not normalize it to that of lean mice. However, decreased basal blood glucose and suppression of insulin resistance as a result of RA treatment are consistent with the reduction of the retinol:RBP4 ratio.

Discussion

In this study, we investigated the effects of RA on glucose homeostasis in a type 2 diabetic *ob/ob* mouse model. In addition, we examined the relationship between insulin sensitivity and retinol-RBP4 levels. Obesity in this insulin-resistant mouse model is due to a mutation in the obesity gene that codes for leptin. These mice exhibit profound obesity, insulin resistance, and metabolic abnormalities such as hyperglycemia, hyperinsulinemia, and glucose intolerance, which phenotypically resemble human type 2 diabetes (33). These mice also exhibit reduced metabolism and body temperature. We used 9- to 10-wk-old *ob/ob*

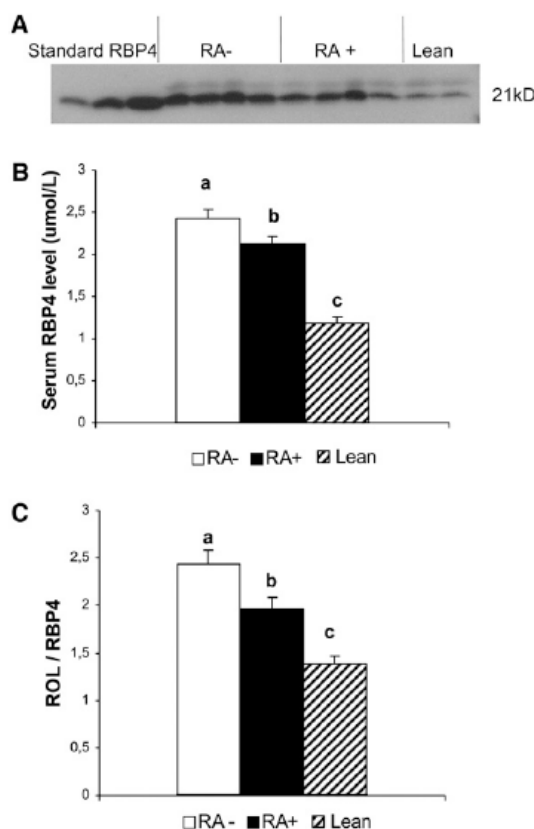


FIGURE 4 Serum RBP4 concentrations (A,B) and the serum retinol:RBP4 ratio (C) in RA⁻ and RA⁺ *ob/ob* mice and in lean mice on d 16. (A) Representative Western blotting of RBP4 in serum. In B and C, values are mean \pm SEM, $n = 8$ except lean, $n = 4$. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

mice, because at this age, they have well-developed insulin resistance and hyperinsulinemia (34). Our results clearly demonstrated that RA significantly improved glucose homeostasis. Basal glucose levels were significantly lower at d 9 and were not altered until the end of treatment (16 d), indicating maintenance of lower glucose levels with long-term administration rather than an acute hypoglycemic effect after a single dose. In addition, RA treatment significantly ameliorated glucose and insulin tolerance.

Several authors have reported that vitamin A is involved in the regulation of adiposity and energy balance (35,36). Mice receiving vitamin A lost weight (37) and it was recently observed that obese mice generated by a high-fat diet lost weight when they consumed a RA diet for 5 wk (38). Although RA suppressed insulin resistance in this study, it did not lower basal glucose levels. We administered RA orally to diabetic mice for 16 d and they lost 10% of their weight. Because the food intake of RA-treated mice did not differ from that of untreated controls, the weight loss of these mice reflected an improvement in energy expenditure.

We have previously demonstrated that RA in the diet dramatically lowers circulating retinol levels, probably due to a feedback signal generated by peripheral tissues (30,31). A recent experiment showed decreased adipose-RBP4 production in mice administered RA subcutaneously for 4 d (39), suggesting that the lower RBP4 levels in RA⁺ mice in the current study

could be the result of diminished synthesis and secretion of adipose-derived RBP4. Because a series of investigations in mice and humans has shown a strong relationship between serum RBP4 and obesity-induced diabetes, we wanted to test whether RA treatment in diabetic mice lowers serum RBP4 and improves insulin sensitivity. Our experiments on *ob/ob* mice revealed a serum RBP4-lowering effect of RA and a concomitant increase in insulin sensitivity. It is likely that the overall effects of RA in enhancing glucose homeostasis are due not only to decreased serum RBP4 but also to the activation of insulin-sensitizing genes through RAR, RXR, and PPAR (40,41). This view is supported by a recent report that RA represses obesity and insulin resistance by activating PPAR β/δ and RAR (38). Another study found that lowering only serum RBP4 was not sufficient to improve insulin sensitivity in obese mice (39). In this investigation, synthesized non-retinoid A1120, a small molecule that binds with high affinity to RBP4, displaced TTR from RBP4-TTR complexes and decreased serum RBP4 but was unable to enhance insulin sensitivity. It is noteworthy that a retinoid analogue, fenretinide, also lowered serum RBP4 by a mechanism similar to non-retinoid A1120 but improved insulin sensitivity, indicating the involvement of alternative mechanisms (13,42). These studies and our experiments suggest that a retinoid moiety that decreases serum RBP4 appears to be important in regulating glucose homeostasis in diabetic conditions. The observation of serum RBP4 elevation in obese and insulin-resistant mice and humans indicates that vitamin A metabolism may be altered under these conditions. However, limited information is available on the rate of vitamin A metabolism in diseases such as diabetes, where vitamin A transport is enhanced by serum RBP4 elevation. It is possible that, in addition to other factors, lowering serum RBP4 may be important for the suppression of insulin resistance.

In the fasted state, retinol bound to RBP4 circulates in the blood in approximately a 1:1 molar ratio and studies have shown that a small quantity of retinol unbound to RBP4 is also present in the circulation (43,44). Although, theoretically, the retinol:RBP4 ratio in blood is 1, the measured ratio is >1 due to the presence of free retinol in the circulation. Motani et al. (42) reported a serum retinol:RBP4 ratio of ~ 1.78 in lean mice, which was slightly higher than our values in such animals (1.38; Fig. 4). Several authors have discerned an association between the serum retinol:RBP4 ratio with obesity and type 2 diabetes (16,45,46), suggesting that the serum retinol:RBP4 ratio is a more relevant indicator of type 2 diabetes than serum RBP4 alone. In our studies, we found a significant increase in the serum retinol:RBP4 ratio in *ob/ob* mice compared with lean mice and treatment with RA lowered the ratio by 20%. Because the decreased serum retinol:RBP4 ratio is consistent with the improvement in glucose homeostasis, we propose that it could be used to test the efficacy of drugs that improve the glycemic index. However, more work in several insulin-resistant animal models is needed to strengthen this hypothesis.

Interestingly, a significant amount of unbound retinol (based on the retinol:RBP4 ratio), a potential toxin, is present in the circulation of *ob/ob* mice. It is not clear whether excess free retinol in serum contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes. In this context, recent studies have reported a greater retinol:RBP4 ratio in cerebrospinal fluid than in the serum of participants with idiopathic intracranial hypertension, indicating the involvement of free retinol in cerebrospinal fluid in the pathogenesis of intracranial hypertension (47,48).

In summary, this work demonstrates that RA treatment significantly improves insulin sensitivity and glucose homeosta-

sis in insulin-resistant *ob/ob* mice. Our results support the antidiabetic activity of RA that could prove to be of clinical importance and provide new treatment strategies in the management of type 2 diabetes. In addition, the serum retinol:RBP4 ratio may provide the therapeutic potential of drugs in treating type 2 diabetes.

Acknowledgment

P.V.B. designed research and wrote the paper. D.C.M. and A.S. conducted research. All authors read and approved the final version of the paper.

Literature Cited

- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev*. 2000;80:1021–54.
- Rosenthal DF, Lancillotti F, Darwiche N, Sinha R, De Luca LM. Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In: R. Blomhoff, editor. *Regulation of epithelial differentiation by retinoids*. New York: M. Decker; 1994. p. 425–50.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 1996;10:940–54.
- Warrell RP, Frankel SR, Miller WH, Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans retinoic acid). *N Engl J Med*. 1991;324:1385–93.
- Haeflrich T, Löffler H, Glass B, Gassmann W. Repeated complete remission in a patient with acute promyelocytic leukemia after treatment with 13-cis retinoic acid first and with all-trans retinoic acid in relapse. *Clin Invest*. 1993;71:774–9.
- Petkovich PM. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:S136–42.
- Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene*. 2003;22:7305–15.
- Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev*. 1989;10:308–16.
- Vogel S, Gamble MV, Blaner WS. Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. In: Nau H, Blaner WS, editors. *Hand book of experimental pharmacology, retinoids*. Heidelberg (Germany): Springer-Verlag; 1999. p. 31–95.
- Monaco HL, Rizzi M, Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science*. 1995;268:1039–41.
- Soprano DR, Blaner WS. Plasma retinol-binding protein. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. *The retinoids, biology, chemistry and medicine*. New York: Raven Press; 1994. p. 257–82.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantadosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1992;267:1805–10.
- Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny KK, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436:356–62.
- Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006;354:2552–63.
- Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1886–90.
- Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, l'Allemand D, Spinaz GA, Zimmerman MB. Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4359–65.
- Qi Q, Ye X, Zhao F, Huang P, Hu FB, Franco OH, Wang J, Li H, Liu Y, et al. Elevated retinol-binding protein 4 levels are associated with metabolic syndrome in Chinese people. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4827–34.
- Krzyzanowska K, Zemany L, Krugluger W, Scherthaner GH, Mittermayer F, Schnack C, Rahman R, Brix J, Kahn BB. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:1115–22.
- Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1168–71.
- Balogopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1971–4.
- Lim S, Choi SH, Jeong IK, Kim JH, Moon MK, Park KS, Lee HK, Kim YB, Jang HC. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol binding protein-4 concentrations in young and middle aged women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:2263–8.
- Kovacs P, Geyer M, Berndt J, Kloting N, Graham TE, Bottcher Y, Enigk B, Tonjes A, Schleinitz D, et al. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein 4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes*. 2007;56:3095–100.
- Hu C, Jia W, Zhang R, Wang C, Lu J, Wu H, Fang Q, Ma X, Xiang K. Effect of RBP4 gene variants on circulating RBP4 concentration and type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet Med*. 2008;25:11–8.
- Broch M, Vendrell J, Ricart W, Richart C, Fernandez-Real JM. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care*. 2007;30:1802–6.
- Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2007;195:150–8.
- Silha JV, Nyomba BL, Leslie WD, Murphy MJ. Ethnicity, insulin resistance, and inflammatory adipokines in women at high and low risk for vascular disease. *Diabetes Care*. 2007;30:286–91.
- Yagmur E, Weiskirchen R, Gressner AM, Trautwein C, Tacke F. Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care*. 2007;30:1168–72.
- Graham TE, Wason CJ, Blüher M, Kahn BB. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia*. 2007;50:814–23.
- Keilson B, Underwood BA, Loerch JD. Effects of retinoic acid on the mobilization of vitamin A from the liver in rats. *J Nutr*. 1979;109:787–95.
- Bhat PV, Lacroix A. Effects of retinoic acid on the metabolism of vitamin A in rat liver. *Nutr Res*. 1986;6:429–35.
- Bhat PV, Lacroix A. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69:826–30.
- McClean SW, Ruddel ME, Gross EG, DeGiovanna JJ, Peck GL. Liquid-chromatography assay for retinol (vitamin A) and retinol analogs in therapeutic trials. *Clin Chem*. 1982;28:693–6.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425–32.
- Genuth SM, Przybylski RJ, Rosenberg DM. Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice. *Endocrinology*. 1971;88:1230–8.
- Bonet ML, Ribot J, Felipe F, Palou A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:1311–21.
- Villarroya F, Giral M, Iglesias R. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23:1–6.
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes*. 2004;53:882–9.
- Berry DC, Noy N. All-trans retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor β/δ and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol*. 2009;29:3286–96.
- Mercader J, Granados N, Bonet ML, Palou A. All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22:363–72.
- Lenhard JM. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels*. 2001;7:249–58.

41. Shin DJ, Odom DP, Scribner KB, Ghoshal S, McGrane MM. Retinoid regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in liver. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;195:39–54.
42. Motani A, Wang Z, Conn M, Siegler K, Zang Y, Liu Q, Johnstone S, Xu H, Thibault S, et al. Identification and characterization of a non-retinoid ligand for retinol-binding protein 4 which lowers serum retinol-binding protein 4 levels *in vivo*. *J Biol Chem.* 2009;284:7673–80.
43. Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantadosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, et al. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 1999;18:4633–44.
44. Biesalski HK, Frank J, Beck SC. Biochemical but not clinical vitamin A deficiency results from mutations in the gene for retinol binding protein. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:931–6.
45. Mills JP, Furr HC, Tanumihardjo SA. Retinol to retinol-binding protein (RBP) is low in obese adults due to elevated apo-RBP. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233:1255–61.
46. Erikstrup C, Mortensen OH, Nielsen AR, Fischer CP, Momgaard P, Petersen AM, Krogh-Madsen R, Lindegaard B, Erhardt JG, et al. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11:204–12.
47. Warner JE, Larson AJ, Bhosale P, Digre KB, Henley C, Alder SC, Katz BJ, Bernstein PS. Retinol-binding protein and retinol analysis in cerebrospinal fluid and serum of patients with and without idiopathic intracranial hypertension. *J Neuroophthalmol.* 2007;27:258–62.
48. Libien J, Blaner WS. Retinol and retinol-binding protein in cerebrospinal fluid: can vitamin A take the “idiopathic” out of idiopathic intracranial hypertension? *J Neuroophthalmol.* 2007;27:253–7.

Article: All-trans Retinoic Acid Lowers Serum Retinol-Binding Protein 4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice – Manolescu DC, Sima A, Bhat PV.

Journal of Nutrition 2010 Feb;140(2):311-6. doi: 10.3945/jn.109.115147. Epub 2009 Dec 23.

Cited in 51 publications from 2010 to 2017:

- Effect of all-trans retinoic acid-loaded liposomes on adipogenesis of obese mice K. Kawano, Y. Isoda, H. Toma, A. Fukasawa, Y. Hattori
- Energy regulation in newly diagnosed TB with chronic energy deficiency: Free fatty acids and RBP4 Nurpudji A Taslim, Devintha Virani, Ni Ketut Sumartini, Kamila, Irawaty Djaharuddin
- Aptamer-Conjugated Calcium Phosphate Nanoparticles for Reducing Diabetes Risk via Retinol Binding Protein 4 Inhibition Raheleh Torabi, Hedayatollah Ghourchian, Massoud Amanlou, Parvin Pasalar
- The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis Ali Saeed, Mark Hoekstra, Martijn Oscar Hoeke, Janette Heegsma, Klaas Nico Faber
- All-trans retinoic acid shifts rosiglitazone-induced adipogenic differentiation to osteogenic differentiation in mouse embryonic... Ying Shao, Qian Zhao Chen, Yu-Hua Zeng, Yang Li, Bai-Cheng He
- Transcriptome Analysis Reveals that Vitamin A Metabolism in the Liver Affects Feed Efficiency in Pigs Yunxia Zhao, Ye Hou, Fei Liu, An Liu, Xinyun Li
- Jejunal Infusion of Glucose Decreases Energy Intake to a Greater Extent than Fructose in Adult Male Rats Alexander A Moghadam, Timothy H Moran, Megan J Dailey
- Carotenoids in Adipose Tissue Biology and Obesity M. Luisa Bonet, Jose A. Canas, Joan Ribot, Andreu Palou
- Whole Blood RNA as a Source of Transcript-Based Nutrition- and Metabolic Health-Related Biomarkers Petar D Petrov, M Luisa Bonet, Bárbara Reynés, Paula Oliver, Joan Ribot
- Serum RBP, Obesity, and Insulin Resistance Pangala Bhat, Daniel-Constantin Manolescu
- Cooperative action of bioactive components in milk fat with PPARs may explain its anti-diabetogenic properties Peter W. Parodi
- Hypoglycemic effect of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro differentiated into islet-like cells L.-M. Zhang, R.-H. Wang, M.-R. Wan, Q. Wen, Y. Shao
- Regulation of retinol binding protein 4 expression and its relation to adipogenesis in bovine adipocytes Abd Eldaim Mabrouk Attia, Mabrouk Raqab EL-Sabaq
- Retinol as a cofactor for PKC -mediated impairment of insulin sensitivity in a mouse model of diet-induced obesity Elena Shabrova, Beatrice Hoyos, Valerie Vinogradov, Y.-K. Kim, Ulrich Hammerling
- High dietary fat-induced obesity in Wistar rats and type 2 diabetes in non-obese Goto-Kakizaki rats differentially affect retinol... Tomomi Shirai, Yuta Shichi, Miyuki Sato, Yuri Tanioka, Yuji Yamamoto
- Retinol binding protein-4 and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes mellitus treated with oral antidiabetic... Anas H Sadek, Omar F Abdul-Rasheed, Mahmood S Khudhair
- WY14643 combined with all-trans retinoic acid acts via p38 MAPK to induce "browning" of white adipocytes in mice J Wang, G J Sun, J Ding, J X Zhang, S J Wang
- Effects of conjugated linoleic acid on the expression levels of miR-27 and miR-143 in pig adipose tissue R L Qi, Y Chen, J X Huang, F.Y. Yang
- Retinoic acid inhibits tissue factor and HMGB1 via modulation of AMPK activity in TNF- α activated endothelial cells and... Young Min Kim, Jung Hwan Kim, Sang Won Park, Hye Jung Kim, Ki Churl Chang
- Molecular Mechanisms of Retinoid Receptors in Diabetes-Induced Cardiac Remodeling Jing Pan, Rakeshwar S Guleria, Sen Zhu, Kenneth M Baker
- Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity M. Luisa Bonet, Jose A Canas, Joan Ribot, Andreu Palou
- Possible resting metabolic rate modification by the circulating RBP4 in obese subjects Hasti Ansari, Khadijeh Mirzaei, Anita Malek, Azam Najmafshar, Arash Hossein-nezhad
- Vitamins and Type 2 Diabetes Mellitus Valdés-Ramos Roxana, Guadarrama-López Ana Laura, Martínez-Carrillo Beatriz Elina, Benítez-Arciniega Alejandra Donai
- All trans-retinoid acid ameliorates hepatic steatosis in mice by a novel transcriptional cascade Seong-Chul Kim, Chun-Ki Kim, David Axe, Aaron Cook, Yoon Kwang Lee
- All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents... Daniel-Constantin Manolescu, Marek Jankowski, Bogdan A Danalache, Donghao Wang, Jolanta Gutkowska
- A comparative study: the effect of 17- β estradiol and antioxidants combination on some menopausal changes in... Nihal M. El Habachi, Hala M. Maklad, Gihan M. Sharara, Eman A. Allam, Eman M. Fawzy
- Could T cells be involved in lung deterioration and hyperglycemia in cystic fibrosis? S. Ziai, A. Coriati, M.-S. Gauthier, R. Rabasa-Lhoret, M.V. Richter
- REGULATION OF RETINOL BINDING PROTEIN 4 EXPRESSION AND ITS RELATION TO ADIPOGENESIS IN BOVINE ADIPOCYTES Abd Eldaim, Mabrouk Attia, Mabrouk Raqab, El -Sabaq

- [Roles of Vitamin A Metabolism in the Development of Hepatic Insulin Resistance-Guoxun Chen](#)
 - [Supplementation with 9-cis \$\beta\$ -carotene-rich alga *Dunaliella* improves hyperglycemia and adipose tissue inflammation in...](#)-Ayelet Harari, Dror Harats, Daniella Marko, Hofit Cohen, Aviv Shaish
 - [All-trans-Retinoic Acid Ameliorates Hepatic Steatosis in Mice by a Novel Transcriptional Cascade-Seong-Chul Kim, Chun-Ki Kim, David Axe, Aaron Cook, Yoon Kwang Lee](#)
 - [Activation of Retinoid Receptor-Mediated Signaling Ameliorates Diabetes-Induced Cardiac Dysfunction in Zucker Diabetic Rats-Rakeshwar S Guleria, Amar B Singh, Irina T Nizamutdinova, Tatiana Souslova, Jinq Pan](#)
 - [The Effect of Vitamin A on Thyroid in Premenopausal Women-Mahdieh Abbasalizad Farhanqi, Seyyed Ali Keshavarz, Mohammadreza Eshraighian, Alireza Ostadrahimi, Ali Akbar Saboor-Yaraghi](#)
 - [Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats-N Granados, J Amenqual, J Ribot, H Musinovic, M L Bonet](#)
 - [Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology-Jean-François Landrier, Julie Marcotorchino, Franck Toumiaire](#)
 - [Contrasting effects of type 2 and type 1 diabetes on plasma RBP4 levels: The significance of transthyretin-Raghu Pullakhandam, Ravindranadh Palika, Sudip Ghosh, Geeredy Bhanuprakash Reddy](#)
 - [Stereoselective Formation and Metabolism of 4-Hydroxy-Retinoic Acid Enantiomers by Cytochrome P450 Enzymes-Jakob A Shimshoni, Arthur G Roberts, Michele Scian, Ariel R Topletz, Nina Isoherranen](#)
 - [Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid in HepG2 cells-Jaume Amenqual, Petar Petrov, M Luisa Bonet, Joan Ribot, Andreu Palou](#)
 - [Retinoid Metabolism and Diabetes Mellitus-Eun-Jung Rhee, Jorge Plutzky](#)
 - [Nuclear Receptors Reverse McGarry's Vicious Cycle to Insulin Resistance-David D Moore](#)
 - [Identification of liver proteins altered by type 2 diabetes mellitus in obese subjects-Adamo Valle, Victoria Catalán, Amaia Rodríguez, Fernando Rotellar, Jordi Oliver](#)
 - [Vitamin A-Not for Your Eyes Only: Requirement for Heart Formation Begins Early in Embryogenesis-Maija H Zile](#)
 - [13-cis-Retinoic acid specific down-regulation of angiotensin type 1 receptor in rat liver epithelial and aortic smooth muscle cells-Russell Snyder, Thomas Thekkumkara](#)
 - [Chemical Pathology of Homocysteine. V. Thioretinamide, Thioretinaco, and Cystathionine Synthase Function in...](#)-Kilmer S McCully
 - [Molecular mechanisms for anti-aging by natural dietary compounds-Min-Hsiung Pan, Ching-Shu Lai, Mei-Ling Tsai, Jia-Ching Wu, Chi-Tang Ho](#)
 - [Intake of Milk with Micronutrients Increases the Effect of an Energy-Restricted Diet to Reduce Body...](#)-Jorge L Rosado, Olga P García, Dolores Ronquillo, Deisy Hervert-Hernández, Sandra García
 - [Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid-M Luisa Bonet, Joan Ribot, Andreu Palou](#)
 - [Fenretinide Derivatives Act as Disrupters of Interactions of Serum Retinol Binding Protein \(sRBP\) with Transthyretin and the sRBP...](#)-José Angel Campos-Sandoval, Clara Redondo, Gemma K Kinsella, Akos Pal, John B C Findlay
 - [The Natural History of RAL Vein Occlusion: What Do We Know?-Francis Char Decroos, Sharon Fekrat](#)
 - [Retinoid Pathway and Cancer Therapeutics-Nathan Bushue, Yu-Jui Yvonne Wan](#)
-

Article 2, partiellement publié en « *Abstracts* » indexés avec comités de pairs

Retinoic Acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy and promotes beige/brown fat characteristics in diabetic mice

Daniel-Constantin Manolescu, Aurélia Sima, Sylvie Mader and Jean-Louis Chiasson

Historique de l'article

Publication de données préliminaires, comme *Abstracts* indexés, dans les journaux:

(avec D.O.I. Digital Object Identifier/Identifiant Numérique d'Objet-Norme ISO 26324,2012)

Manolescu DC. et al, **2015**, *App. Physiology, Nutrition & Metab.* 40(5):518(495-533)/05.2015

Manolescu DC et al **2013**, *Journal Nutrigenetics & Nutrigenomics* 6(4-5):233(201-255)/10.2013

Manolescu DC. et al, **2013**, *App. Physiology, Nut. & Metabolism*, 38(4):463(433-476)/04.2013

Manolescu DC. et al, **2013**, *Diabetes & Metabolism*, 39(1):A44/03.2013

Manolescu DC. et al. **2012**, *Dietetistes Québec*, 9(3):22/Hiv.02-03.2012

Editing Certificate obtenu pour soumission au groupe scientifique **ELSEVIER** :

Dans sa forme actuelle - avec toutes les suggestions de nos reviseuses (rs) intégrées - notre article a obtenu *l'Editing Certificate*, de l'éditeur scientifique **ELSEVIER**, pour la conformité de l'écriture scientifique et la qualité de l'anglais. C'est la première étape dans la soumission à un journal de leur groupe (ex.: « *Molecular Metabolism* »). Nous ne pouvons plus modifier sa structure et le texte, sans perdre tous nos acquis avec **ELSEVIER**, y compris les frais! \$\$\$

Publications « *In folio* » - Article 2

Certificat linguistique du groupe editorial *ELSEVIER* pour l'Article 2



ELSEVIER

Language Editing Services

Registered Office:
Elsevier Ltd
The Boulevard, Langford Lane,
Kidlington, OX5 1GB, UK.
Registration No. 331566771

To whom it may concern

The paper "Retinoic acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy and promotes beige/brown fat characteristics in ob/ob diabetic mice" by MANOLESCU Daniel-Constantin et al.2017, Faculty of Medecine/Nutrition, University of Montreal, QC, Canada was edited by Elsevier Language Editing Services.

Kind regards,

Elsevier Webshop Support

Project nr: **123494** / Project date: 07-Nov-2017 / Completed: 15-Nov-2017

Manuscript length: Long (6,001 - 12,000 words) - 7 business days

Edit using: **British English** / Area of study: Systems Biology, Medicine/Nutrition

Project status: Finished LE214573 / Supplier completion: 15/11/2017 à 20:28

You can supplement your perfectly language-edited paper with top quality illustrations! These can enhance the impact of your research by demonstrating concepts more clearly than using words alone. With WebShop's illustration services, you can get artistic support from Elsevier's professional illustrators for your scientific and medical research papers and presentations. Upload your drafted illustration, or even just an idea, and we'll send you a free quote within 24 business hours.

Please note: If you make alterations to a manuscript after we return it to you and this manuscript is rejected by a journal for English language errors, you cannot return it to us for free re-editing. However, if you do not alter a manuscript that we have edited and it is rejected by a journal on purely English language grounds, you can receive either a full refund or have your manuscript re-edited free of charge.



Retinoic acid improves vitamin A homeostasis and reduces adipocytes hypertrophy, promoting beige-brown fat in obese and insulin resistant mice- Manolescu DC et al. 2015, App. Physiology, Nutrition & Metab. 40(5):518(495-533)/05.2015

Daniel-Constantin Manolescu¹, Aurélie Sima¹, and Jean-Louis Chiasson¹

¹CRCHUM Hôtel-Dieu, Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Acknowledgements: Special thanks to Dr. Pangala V. Bhat for his retinoid expertise and to Dr. Bénédicte Fontaine-Bisson, Faculty of Health and Nutrition Sciences, University of Ottawa, Ontario, Canada, for her English editing contribution.

Published online 28 April 2015: <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0118>, CNS, Winnipeg, MN, Canada

Introduction

We have previously demonstrated a retinoic acid (RA) treatment in diabetic model rodents reduces serum ROL, RBP4, glucose levels, insulin resistance, body weight and visceral fat, despite iso-caloric food intake.

Aims

The aims were to determine whether RA affects: 1) Endogenous vitamin A levels and expression of genes from vitamin A metabolism - uptake (STRA6), transport (RBP4, CRBP, CRABP), storage (LRAT), oxidation (RDH, RALDH), catabolism (CYP26A1 and CYP26B1) and nuclear receptors (RAR, RXR) in subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), skeletal muscles (SM) and liver (LIV). 2) Expression in SF, of genes from mitochondria-genesis (PGC1) and energy metabolism (UCP1) specific for beige-brown fat. 3) Morphology of adipocytes in SF.

Methods

Female 9-week-old B6.V-Lep/J ob/ob mice (n=16) obese and insulin resistant, divided in two groups, a group (n=8) treated with 100 µg of *at*-RA dissolved in 100 µl corn oil (vehicle) daily (2 µg/gbw/day) by stomach intubation for 16 days, and a group (n=8) with vehicle alone. Gene (mRNA) was evaluated by RT-PCR, RBP4 by Western Blot, vitamin A by HPLC, and fat morphology by histological study.

Results

RA treatment resulted in: 1) tissue specific expression for vitamin A metabolism genes in SF, VF, SM, and LIV 2) normalization of ROL concentrations in SF, VF and SM and RE in SM and LIV with increased total vitamin A (ROL+RE) in SF, VF and LIV; 3) normalization of RBP4 protein levels in SF, VF, LIV; 4) increased expression of PGC1 and UCP1 in SF; 5) reduced adipocytes size in SF.

Conclusions

The vitamin A metabolism genes are tissue specific affected by RA, improving on vitamin A homeostasis. Lower body weight despite iso-caloric food intake, increased expression of PGC1 and UCP1 genes and reduced adipocytes sizes of RA treated animals suggests higher basic metabolism (like in beige-brown fat).

Note: Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Aurelia Sima is a fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015. Project support: CIHR, CRCHUM. Student support: CIHR, FRQS, NUT/FESP, CRCHUM, Prêts Gvt. Qc.

KARGER

Medical and Scientific Publishers
 Basel · Freiburg · Paris ·
 London · New York · Chennai ·
 New Delhi · Bangkok · Beijing ·
 Shanghai · Tokyo · Kuala Lumpur ·
 Singapore · Sydney

Journal of **Nutrigenetics** and **Nutrigenomics**

Official Journal of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics

Official Journal of the
 International Society of
 Nutrigenetics/Nutrigenomics



www.isnn.info

Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, Volume 6, No. 4-5, October 2013, Page 233, Nr.64

Impacts and Therapeutic Potential of Retinoid (RA) In Obesity and Type 2 Diabetes. A Nutrigenomic Approach Manolescu DC et al 2013, Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics 6(4-5):233(201-255)/10.2013

Daniel-Constantin Manolescu, Aurélie Sima, Jean-Louis Chiasson, and Pangala V. Bhat

CRCHUM-HD, Faculty of Medicine and Nutrition, Université de Montreal, Montreal, Canada

published on line 3.October.2013: <https://www.karger.com/Article/Abstract/354973> , ISNN, Québec, QC, Canada, 5-8.Oct.2013



NRC

Research Press

Applied Physiology, Nutrition & Metabolism

Applied Physiology, Nutrition & Métabolisme, Volume 38, Issue 4, April 2013, Page 463, Canadian Nutrition Society (CNS)



Vitamin A (RA) lowers glycaemia and influences retinoid, energy, and insulin metabolism in diabetic mice (ob/ob) Manolescu DC et al 2013, Applied Physiology, Nutrition & Metabolism 38(4):463(433-476)/04.2013

Daniel-Constantin Manolescu, Aurélie Sima, Jean-Louis Chiasson, and Pangala V. Bhat

CRCHUM Hôtel-Dieu, Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Accepted Sept.21, 2012, published online 22.April.2013: <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0099> , CNS, Québec, QC, Canada



Diabetes & Metabolism, Volume 39, Supplement 1, 26–29 March 2013, Page A44; Société Francophone du Diabète (SFD)

P1054 : L'influence de la vitamine a (ROL, RA) sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie du glucose chez des souris diabétiques (Ob/Ob)-Manolescu DC et al 2013, Diabetes & Metabolism 39(1):A44/03.2013

D.-C. Manolescu, A. Sima, P.V. Bhat, J.-L. Chiasson, CRCHUM-Université de Montréal, Montréal, Canada

Available online 9 April 2013: [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(13\)71800-7](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(13)71800-7) , Montpellier, France, UE



Metabolic and biomolecular effects of retinoic acid treatment on diabetic mice (*ob/ob*)

Manolescu DC et al 2012, Applied Physiology, Nutrition & Metabolism 37(5):583(565-598)/05.2012

Daniel-Constantin Manolescu, Aurélie Sima, and Pangala V. Bhat

CRCHUM, Lab. Nutrition et Cancer, Clinique de Recherche sur le Diabète, Fac. Médecine/Nutrition, Univ. de Montréal, QC, Canada.

published on line Mai.2012: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/h2012-046#>, CNS, Vancouver, BC, Canada

Introduction

Recent investigations have demonstrated that serum retinol binding protein 4 (RBP4) is high in insulin-resistant mice. Lowering RBP4 improves insulin sensitivity. We reported (Manolescu et al. 2010, J. Nutr. 140: 311) that retinoic acid (RA) administration decreased serum RBP4, suppressed insulin resistance, and improved glucose homeostasis in diabetic *ob/ob* mice.

Aims

The goals were to investigate the effects of RA on the expression of retinoid homeostatic genes related to retinol metabolism in *ob/ob* mice, and to find whether any other genes from pathway of interest in obesity and type 2 diabetes are affected by RA.

Methods

Tissues total RNA extraction (guanidine method) and cDNA preparation (by reverse transcriptase). Gene expression levels (ARNm) by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-q-PCR) and ROL levels by HPLC. Expression levels of genes that regulate retinol (ROL) uptake (STRA6), transport (RBP4), and esterification (LRAT and CRBP1), and genes involved in RA synthesis (RDH10 and RALDH1), transport (CRABP1 and 2), and catabolism (CYP26A1 and B1) were investigated in skeletal muscle (Sm), subcutaneous fat (Sc), and visceral fat (Vis) of RA treated and untreated *ob/ob* mice.

Results

Our RA treatment significantly reduced STRA6 transcripts and increased LRATS transcripts in Sm and Vis while RBP4 mRNA levels were decreased only in Sc. RA affected the expression of CRBP1 only in Sc and induced CRBP1 expression levels by 3-fold. RA differentially affected the expression of RALDH1, CRABP1, CYP26A1, and B1 in Sm, Sc, and Vis. Other genes of interest pathways in obesity and T2D (energy metabolism, insulin sensitivity, cardio-metabolic) were also affected by RA.

Conclusions

Experiments are still in progress. Lower serum RBP4 levels observed in RA treated *ob/ob* mice could be due to lower synthesis of RBP4 in Sc. RA affected retinoid homeostatic genes and other T2D interest gene in a tissue-specific manner.

Note: Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship and Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012). Supported by: CIHR/IRSC, FRQS, CRCHUM, NUT/FESP-Université de Montréal, Prêts Gvt. Québec.

SOMMAIRES DE RECHERCHE

EFFETS DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE SUR DES GÈNES DU MÉTABOLISME DE LA VITAMINE A CHEZ DES SOURIS DIABÉTIQUES

Introduction

L'obésité est associée au diabète insulino-résistant (type 2). Dans une étude publiée en 2008, B. Khan et al. ont montré un taux sérique élevé de RBP4 (retinol-binding protein 4, ou protéine de liaison du rétinol) et d'adipokines (cytokines sécrétées dans le gras) relié au diabète. Certains agents qui abaissent la RBP4 augmentent la sensibilité à l'insuline. Ceci donne une justification pour la mise au point d'anti-diabétiques visant une baisse des concentrations sériques de RBP4. Cependant, il faut éviter une déplétion métabolique des rétinolides. Dans une étude pilote (*The Journal of Nutrition*, 140: 311-316, 2010), D.C. Manolescu, A. Sima et P.V. Bhat ont démontré une réduction significative des concentrations sériques de RBP4 et de la résistance à l'insuline, une amélioration de l'homéostasie glycémique et une baisse du ratio rétinol/RBP4 circulant chez des souris diabétiques *ob/ob* (dépourvues de leptine) traitées avec l'acide rétinolique (AR).

Hypothèse

Des modifications du métabolisme des rétinolides obtenues par le traitement à l'acide rétinolique figurent parmi les mécanismes biomoléculaires entraînant une amélioration de l'homéostasie glycémique. Ces modifications peuvent varier selon les tissus (ex. : les tissus adipeux, étiologiquement plus impliqués dans le diabète de type 2), avec des différences métaboliques (gras sous-cutané vs gras viscéral), même à l'état de santé.

Objectifs

Étudier les principaux tissus impliqués dans l'homéostasie glycémique et la sensibilité à l'insuline (gras sous-cutané, gras viscéral, muscles squelettiques et foie) afin d'évaluer : 1) les effets de l'acide rétinolique exogène sur l'expression des gènes du métabolisme du rétinol, soit transport (RBP4, CRABP1 et CRABP2), réception cellulaire (STRA6), estérification (LRAT et CRBP1), synthèse (RDH10 et RALDH1) et catabolisme (CYP26A1 et vitamine B1); 2) la dynamique des rétinolides (quantitative et qualitative) dans ces tissus.

Méthodologie

Étude comparative réalisée avec deux groupes de souris diabétiques (*ob/ob*), soit huit souris traitées avec AR (100 µg/jour dans huile de maïs, intubation gastrique seize jours) et huit souris témoins (recevant juste de l'huile de maïs). 1) Analyses comparatives (intra-tissulaire tous tissus; inter-tissulaire gras sous-cutané et viscéral)

de l'expression des gènes du métabolisme des rétinolides par RT-q-PCR. 2) Mesures comparatives (HPLC) par tissus des rétinolides (atROL et isomères) par HPLC.

Résultats

1) L'AR a significativement réduit la transcription du STRA6 et augmenté celle du LRAT dans les muscles et le gras viscéral. 2) L'AR a réduit significativement l'expression de la RBP4 et augmenté celle du CRBP1 dans le gras sous-cutané. 3) L'AR a influencé diversement l'expression des RALDH1, du CRABP1, du CYP26A1 et de la vitamine B1 dans les muscles et les tissus gras.

Conclusions:

La réduction de l'expression de la RBP4 par l'AR dans le gras sous-cutané participe à la réduction globale de la concentration sérique de RBP4 sérique. L'AR influence l'expression des gènes du métabolisme des rétinolides diversement selon les tissus.

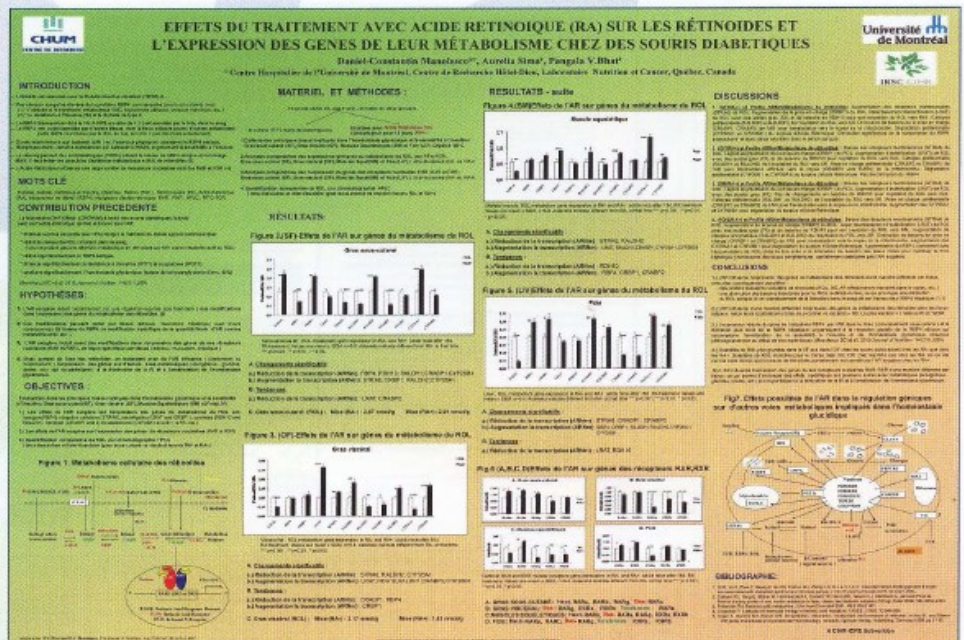
En cours

Mesures HPLC des rétinolides, études sur le foie, comparaisons avec l'expression des gènes du métabolisme des rétinolides des souris en santé.

(Subventionné par Instituts de recherche en santé du Canada)

Daniel-Constantin Manolescu*, Aurelia Sima* et Pangala V. Bhat*

Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM-Hôtel-Dieu), Laboratoire de nutrition et cancer, et Département de nutrition, Faculté de médecine, Université de Montréal



Retinoic acid treatment is associated with tissue specific expression for the vitamin A metabolism genes, and with increased UCP1 and PGC1 α in *ob/ob* diabetic mice

Daniel-Constantin Manolescu^{1,2}, Aurélie Sima^{1,2}, Sylvie Mader², Jean-Louis Chiasson¹

Abstract

Introduction: We have already demonstrated that retinoic acid (RA) treatment in obese diabetic mice (*ob/ob*) reduces serum vitamin A (ROL) and its transporter (RBP4), fasting glycaemia, insulin resistance (IR), body weight (bw) and visceral adipocytes diameter, despite a similar food intake and motor reflex activity in treated and not treated groups.

Aims: To determine whether RA affects: 1) vitamin A metabolism gene expression for uptake, transport, storage, oxidation and nuclear receptors in subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), skeletal muscles (SM) and liver (LIV); 2) the expression of two characteristic genes (PGC1 α ;UCP1) of beige/brown fat metabolism.

Methods: Sixteen 9-week-old B6.V-Lep/J *ob/ob* mice obese and IR, were treated (n=8) with 100 μ g *at*RA (~ 2 μ g/gbw/day) in 100 μ l corn oil (vehicle), and (n=8) with vehicle only, by gavages for 16 days. Eight lean mice served as healthy controls. Genes (mRNA) were evaluated by RTq-PCR.

Results: RA treatment induced: 1) tissues' characteristic modulations of gene expression from vitamin A metabolism; 2) increased PGC1 α and UCP1 gene expression in subcutaneous fat (SF) and in visceral fat (VF) tissues.

Conclusions: RA treatment induces tissue specific retinoid metabolism gene expression heading to improve on vitamin A homeostasis. An increased gene expression (mRNA) of PGC1 α and particularly of UCP1 suggests beige/brown fat presence.

Keywords: retinoic acid, vitamin A metabolism, RBP4, PGC1 α , UCP1, beige/brown fat, obesity, insulin resistance, diabetes.

Retinoic acid normalises tissues vitamin A and RBP4 concentrations and reduces adipocytes hypertrophy in *ob/ob* diabetic mice

Daniel-Constantin Manolescu¹, Aurélie Sima¹, Jean-Louis Chiasson¹ and Sylvie Mader²

Abstract

Introduction: We have already demonstrated that retinoic acid (RA) treatment in obese diabetic mice (*ob/ob*) reduces serum vitamin A (ROL) and its transporter (RBP4), fasting glycaemia, insulin resistance (IR), body weight (bw) and visceral adipocytes diameter, despite a similar food intake and motor reflex activity in treated and not treated groups.

Aims: To determine whether RA affects: 1) the ROL, retinyl esters (RE) and 2) the RBP4 protein, concentrations in subcutaneous fat (SF), visceral fat (VF), skeletal muscles (SM) and liver (LIV); 3) the SF and VF adipocytes morphology.

Methods: Sixteen 9-week-old B6.V-Lep/J *ob/ob* mice obese and IR, were treated (n=8) with 100 µg *at*RA (~ 2µg/gbw/day) in 100 µl corn oil (vehicle), and (n=8) with vehicle only, by gavages for 16 days. Eight lean mice served as healthy controls. The retinoid were evaluated by HPLC, the RBP4 protein by Western Blot, and fat morphology by staining and histology observations. Motor reflex was evaluated by tail suspension.

Results: RA treatment induced: 1) normalization of ROL concentrations in SF, VF, SM and of RE in SM and LIV; 2) RBP4 protein normalization in SF, VF and LIV; 3) reduced the adipocyte hypertrophy both in the SF and the VF.

Conclusions: RA treatment improves on vitamin A homeostasis and reduces adipocytes sizes (so the body lipid content) despite similar food intake, suggesting improvement in energy metabolism. Specific fat tissues morphology suggests beige/brown fat presence.

Keywords: retinoic acid, vitamin A metabolism, RBP4, beige/brown fat, autophagy, obesity, insulin resistance, diabetes.

Article 3, publié à l'APNM CNS/ NRC Press, 2014

All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice

Daniel-Constantin Manolescu, Marek Jankowski, Bogdan A. Danalache, Donghao Wang

Tom L. Broderick, Jean-Louis Chiasson and Jolanta Gutkowska

Applied Physiology Nutrition and Metabolism 39; 1127-1136; 04.2014

Historique de l'article

Applied Physiology Nutrition and Metabolism publication statements:

- Manuscript received January 10, **2014**
- Revision accepted April 16, **2014**
- First published online Avril 30, **2014**

Evaluation CIHR/IRSC Canada

Application Number / Numéro de demande: 331383

Name of Applicant / Nom du candidat: MANOLESCU, Daniel Constantin

Review Type / Type d'évaluation: Committee Member 2/Membre de comité 2

Competition: 2014-05-26 Travel Awards - Institute Community Support

Concours: 2014-05-26 Bourses de voyage – Appui communautaire des Instituts

Committee: Institute of Nutrition, Metabolism and Diabetes

Comité: Institut de la nutrition, du métabolisme et du diabète

Comments / Commentaires :

Cette demande est très bien rédigée. J'ai beaucoup apprécié la spécificité et la breveté de comment ce financement profitera au candidat. Le candidat démontre d'excellente qualité de recherche, nombreuses bourse et lettre exceptionnelle. Le 'poster' a été au premier rang par la Société canadienne de nutrition, très impressionnant. La demande est très complète et surtout très convaincante, du grand 'grantmanship'.

ANNEXE 1 –Montréal 28.06.2015

A- Contribution de l'Étudiant PhD

- 1) Contribution aux l'Hypothèses et au Design d'expérimentations, ensemble avec les auteurs seigneurs.
- 2) Tout le travail avec les animaux (approbations éthiques, soins, traitements avec RA, mesures biométriques, observations spécifiques, testes physiologiques, etc. jusqu'à la sacrifice, récolte, conditionnement et traitements des tissus et fluides biologiques)
- 3) Contribution au choix et protocoles des analyses à faire (génomique, protéinémie, histologie spécifique, revues de littérature techniques spécifiques, etc.)
- 4) Contribution à l'analyse génomique (mRNA gènes pour le Vit. A métabolisme)
- 5) Contribution à l'intégration et l'interprétation de tous les résultats globalement.
- 6) Contribution à la rédaction de l'article (design, revue de littérature, écriture de texte, mise en page, infographie, discussion, conclusion)
- 7) Contribution au choix final du magazine scientifique pour la publication de l'article.
- 8) Contribution à répondre aux Reviewers, chaque fois et jusqu'à la publication de l'article.
- 9) Rayonnement et présentation de l'article dans des congrès scientifiques d'envergure.

B- L'importance de l'Article, Rayonnement et Impact international

- 1) Sélection (9 pour tout le Québec) Camp d'Hiver ICAN/CMDO/FRQS Magog 02.2015.
- 2) Choisi le premier (1^{er} sur approx. 100 candidats) dans la sélection préliminaire pour la compétition nationale d'affiches scientifiques du CNS-Canadian Nutrition Society 2014.
- 3) Finaliste (8 sur 55 candidats) à la finale nationale du concours d'affiches scientifiques de la CNS-Canadian Nutrition Society à St-John, Canada en juin 2014.
- 4) Mention d'**Excellence** 2014 par les **IRSC/ CIHR** – Nutrition, Métabolisme et Diabète.
- 5) Remarqué par les Nouvelles de l'Université de Montréal et le CRCHUM qui lui ont consacré une monographie conjointe, dans une mise en contexte globale de nos travaux.
- 6) Monographie remarquée par la Presse Internationale, qui lui a consacré plus d'une centaine (**100**) reprises de presse (sur tous les continents) depuis **juin.2014** (voir sur Google : **Vitamine A and Diabetes + Manolescu DC**) avec d'excellents commentaires.
- 7) Une collaboration efficace entre 2 laboratoires du CRCHUM (Dr.Chiasson et Dr. Gutkowska)

C- L'importance de la revue NRC-APNM « *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* »

- 1) NRC Research Press, est le **plus important éditeur scientifique** au Canada et a fait ses débuts en **1929** en tant qu'édition du Conseil national de recherches du Canada (CNRC).
- 2) APNM est une revue scientifique très bien classé internationalement selon les rangs d'impacts dans ses domaines: Physiologie 48/79, Nutrition 42/76 et Sport Research 25/84
- 3) Une réputation établie et un robuste impact factor de 2,6 sur les 5 dernières années.
- 4) Tribune scientifique conjointe de la CPES-Canadian Physiology and Exercise Society et de la CNS-Canadian Nutrition Society, membre du group NRC Research Press.
- 5) Récemment jumelée avec ANS-American Nutrition Society and The Journal of Nutrition.

All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese *ob/ob* mice

Daniel-Constantin Manolescu, Marek Jankowski, Bogdan A. Danalache, Donghao Wang, Tom L. Broderick, Jean-Louis Chiasson, and Jolanta Gutkowska

Abstract: In hypertensive rodents, retinoic acid (RA) prevents adverse cardiac remodelling and improves myocardial infarction outcome, but its role in obesity-related changes of cardiac tissue are unclear. We hypothesized that all-trans RA (ATRA) treatment will improve the cardioprotective oxytocin-natriuretic peptides (OT-NP) system, preventing apoptosis and collagen accumulation in hearts of *ob/ob* mice, a mouse model of obesity and insulin resistance. Female 9-week-old B6.V-Lep^f *ob/ob* mice ($n = 16$) were divided into 2 groups: 1 group ($n = 8$) treated with 100 μg of ATRA dissolved in 100 μL of corn oil (vehicle) delivered daily ($\sim 2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) by stomach intubation for 16 days, and 1 group ($n = 8$) that received the vehicle alone. A group of nonobese littermate mice ($n = 9$) served as controls. *Ob/ob* mice exhibited obesity, hyperglycaemia, and downregulation of the cardiac OT-NP system, including the mRNA for the transcription factor GATA4, OT receptor and brain NP, and the protein expression for endothelial nitric oxide synthase. Hearts from *ob/ob* mice also demonstrated increased apoptosis and collagen accumulation. ATRA treatment induced weight loss and decreased adipocytes diameter in the visceral fat, thus reducing visceral obesity, which is associated with a high risk for cardiovascular disease. RA treatment was associated with a reduction in hyperglycaemia and a normalization of the OT-NP system's expression in the hearts of *ob/ob* mice. Furthermore, ATRA treatment prevented apoptosis and collagen accumulation in hearts of *ob/ob* mice. The present study indicates that ATRA treatment was effective in restoring the cardioprotective OT-NP system and in preventing abnormal cardiac remodelling in the *ob/ob* mice.

Key words: *ob/ob* mice, retinoic acid, glycaemia, oxytocin, natriuretic peptides, cardiac fibrosis, apoptosis, visceral fat, lipolysis, cardioprotection.

Résumé : Chez les rongeurs hypertendus, l'acide rétinoïque (« RA ») prévient le remodelage défavorable du cœur et améliore l'issue en cas d'infarctus du myocarde, mais on ne connaît pas bien son rôle dans les modifications du tissu cardiaque associées à l'obésité. Nous posons l'hypothèse selon laquelle tous les traitements au RA-trans (« ATRA ») améliorent le système cardioprotecteur oxytocine-peptide natriurétique (« OT-NP ») en prévenant l'apoptose et l'accumulation de collagène dans le cœur des souris *ob/ob*, un modèle d'obésité et d'insulinorésistance de la souris. On divise en deux groupes des souris femelles B6.V-Lep^f *ob/ob* âgées de 9 semaines ($n = 16$), un ($n = 8$) traité au moyen de 100 μg d'ATRA dissous dans 100 μL d'huile de maïs (véhicule) administré quotidiennement ($\sim 2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$) par intubation stomacale durant 16 jours et un groupe ($n = 8$) recevant seulement le véhicule. Un groupe de souris de la même portée et non obèses ($n = 9$) sert de contrôle. Les souris *ob/ob* présentent de l'obésité, une hyperglycémie et une régulation à la baisse du système cardiaque OT-NP incluant l'ARNm pour le facteur de transcription GATA4, le récepteur OT et le NP cérébral et l'expression protéique de la synthèse de l'oxyde nitrique endothélial. Le cœur des souris *ob/ob* présentent plus d'apoptose et d'accumulation de collagène. Le traitement ATRA suscite une perte de poids et une diminution du diamètre des adipocytes dans le gras viscéral, ce qui a pour effet de diminuer le taux d'adiposité viscérale qui est associée à un haut risque de maladie cardiovasculaire. Le traitement RA est associé à une baisse de l'hyperglycémie et à la normalisation de l'expression du système OT-NP dans le cœur des souris *ob/ob*. De plus, le traitement ATRA prévient l'apoptose et l'accumulation de collagène dans le cœur des souris *ob/ob*. La présente étude révèle que le traitement ATRA est efficace pour restaurer le système cardioprotecteur OT-NP et prévenir un remodelage cardiaque anormal chez des souris *ob/ob*. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : souris *ob/ob*, acide rétinoïque, glycémie, oxytocine, peptide natriurétique, fibrose cardiaque, apoptose, gras viscéral, lipolyse, cardioprotection.

Received 10 January 2014. Accepted 16 April 2014.

D.-C. Manolescu. Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Québec, Canada; Departments of Medicine, CRCHUM, Université de Montréal, Québec, Canada.

M. Jankowski and J. Gutkowska. Departments of Medicine, CRCHUM, Université de Montréal, Québec, Canada; Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, CRCHUM, Université de Montréal, Québec, Canada.

B.A. Danalache and D. Wang. Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, CRCHUM, Université de Montréal, Québec, Canada.

T.L. Broderick. Laboratory of Diabetes and Exercise Metabolism, Department of Physiology, Midwestern University, Glendale, AZ, USA.

J.-L. Chiasson. Departments of Medicine, CRCHUM, Université de Montréal, Québec, Canada.

Corresponding author: Jolanta Gutkowska (e-mail: jolanta.gutkowska@umontreal.ca).

Introduction

Retinoic acid (RA), the bioactive metabolite of vitamin A, exerts a broad range of biological effects mainly by controlling various genes expression. RA acts through nuclear retinoid receptors (RAR and RXR), alters protein synthesis in the heart, and regulates embryonic development, tissue homeostasis, and cellular differentiation and proliferation (Pan and Baker 2007). RA also can participate in post-translational modification of proteins in a process known as retinoylation (Myhre et al. 1996). RA is a potent inducer of the oxytocin (OT) system in cardiomyocytes (Gutkowska et al. 1997), a system that stimulates the synthesis of atrial natriuretic peptide (ANP) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), all of which are critically involved in cardioprotection (Tamura et al. 2000; Uruno et al. 2005). In addition, several studies demonstrated beneficial effects of RA treatment in both cellular and animals models of cardiovascular pathologies (Choudhary et al. 2008a; Lü et al. 2003; Paiva et al. 2005; Uruno et al. 2005; Wang et al. 2002; Wu et al. 1996; Zhou et al. 1995), including an improvement in insulin sensitivity in the *ob/ob* mouse model of obesity (Bonet et al. 2012; Manolescu et al. 2010). There is a rapidly growing prevalence of obesity worldwide that is often associated with hypertension, dyslipidemia, and dysglycaemia, which are together globally referred to as the metabolic syndrome, and provides a high risk for the development of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease (CVD). The literature suggests a link between higher risk of CVD and abdominal visceral fat deposits (Hindle et al. 2010).

The *ob/ob* mouse is characterized by extreme obesity, insulin resistance, and hyperglycaemia and thus presents a phenotype considered to be a close counterpart to human obesity and type 2 diabetes (Zhang et al. 1994). Cardiac abnormalities are also observed in this 9- to 10-week-old *ob/ob* mice model and although heart hypertrophy is absent, both cardiac apoptosis and fibrosis develop and further progress with age (Barouch et al. 2006).

Recent evidence from our laboratory indicates that these disturbances in metabolism and alterations in cardiac structure are related to a decreased synthesis related to genes linked to the cardiac OT system (Gutkowska et al. 2009; Jankowski et al. 2010a, 2010b).

The potential beneficial effects of RA in preventing the metabolic and cardiac sequelae in the *ob/ob* mouse are still unclear. Examining the effects of RA in this model of severe obesity warrants investigation, not only because of the well-established risk of developing cardiovascular disease is increased in patients with obesity, but also because RA exerts a robust effect on insulin sensitivity in *ob/ob* mice and induces the OT system in cardiac tissue. Therefore, in this study we investigated the hypothesis that RA treatment of *ob/ob* mice enhances the expression of cardioprotective genes associated with cell survival and prevention of abnormal cardiac remodelling in a model of obesity, insulin resistance, and hyperglycaemia.

Materials and methods

Animals and treatment with all-trans RA (ATRA)

All protocols were approved by the institutional Animal Care and Use Committee of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and in agreement with the recommendations of *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Institute of Health Publication No. 85-23, 1986. Female 9-week-old B6.V-Lep^{ob} *ob/ob* mice ($n = 16$) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). The *ob/ob* mouse was selected because it exhibits elevated blood glucose levels and responds to RA treatment by improving insulin sensitivity (Bonet et al. 2012; Manolescu et al. 2010). In addition, young *ob/ob* mice are already obese and exhibit metabolic abnormalities such as insulin resistance and glucose intolerance that phenotypically resembles human type 2 diabetes. The mice were housed (4 per cage) under controlled environmental conditions and received

standard rodent pellet (Harlan Teklad, No. 2018, 18% protein) containing per kg: 188 g crude protein, 60 g crude oil (9.6 g total saturated, 12.8 g total monounsaturated, and 34.1 g total polyunsaturated), 38 g crude fiber, 500 g carbohydrates (450 g starch and 50 g sucrose), 32.05 g mineral mix, and 2.9 g vitamin mix with a 13 kJ/g energy value. Mice were acclimatized to their new environment for 1 week before the experiment. The 16 mice were randomized to either an obese control (*ob/ob*) not treated (RA⁻) group ($n = 8$) or an ATRA supplemented (*ob/ob* RA⁺) group ($n = 8$). ATRA (Sigma-Aldrich) was dissolved in corn oil (100 μ g in 100 μ l) and administered by stomach intubation daily ($\sim 2 \mu$ g \cdot g body weight⁻¹ \cdot day⁻¹) in the morning for 16 days as previously described (Manolescu et al. 2010). This dose of ATRA significantly improves insulin sensitivity and glucose homeostasis in insulin-resistant *ob/ob* mice. The *ob/ob* (RA⁻) mice received equal volume of corn oil vehicle only. Because ATRA is a relatively unstable compound, the solution was prepared daily and stability was verified by high-performance liquid chromatography as already described (Bhat and Lacroix 1991; Manolescu et al. 2010). To avoid possible RA breakdown from light exposure, all operations with RA were undertaken in dim light. The plasma glucose was measured daily during ATRA treatment of *ob/ob* mice. The serum glucose concentration decreased after 1 week of treatment and remained consistently low after 2 weeks. On the basis of these results we decided to select a 16-day treatment with RA to study cardiac effects in *ob/ob* mice. The animals were sacrificed after an 8-h fast and 24 h after the last RA administration. A group ($n = 9$) of age-matched, nonobese littermate mice served as lean controls.

Histology of cardiac tissue and visceral adipose tissue

Histology of cardiac tissue was prepared as reported previously (Gutkowska et al. 2009). Briefly, hearts were removed and placed in 100 mL of isopentane cooled to the temperature of dry ice and kept at -80°C . Hearts were fixed by perfusion in Tissue fix solution containing neutral buffered formaldehyde solution (Laboratory Gilles Chaput Inc., Montreal, Que., Canada), embedded in wax, and cut into 5- μ m sections. The ventricles were cross-sectioned midway between the apex and the coronary groove. The sections were stained with haematoxylin-eosin and scanned, and the images of surfaces of ventricular cross-sections were measured using Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA; <http://www.nih.gov>). To measure myocytes size, the surfaces of 50 cells were recorded manually, at least in 7 photographs, and calculated in μm^2 . The red collagen deposits in the picro-sirius-stained sections (double refraction) allowed specific separation of red collagen fluorescence on black background. Quantification of collagen was performed using Image-J software and threshold function. DNA apoptosis was investigated by Dead End Fluorometric TUNEL System (cat. no. G3250, Promega Corp., Madison, Wis., USA). Photographs were taken with the inverted microscope equipped with a Q Imaging QICAMIR Fast Digital 1394 CCD camera and Q Capture acquisition software. Immunocytochemistry was performed according to a previously published protocol (Jankowski et al. 2010a).

Measurement of adipocytes surface area

The surface area of adipocytes was measured in visceral fat tissue after embedment in paraffin. Sections of 8 μ m were cut transversally and mounted on polylysine-treated slides (cat. no. P-4981, Esco, Erie Scientific Co., Portsmouth, N.H., USA). The sections were stained with haematoxylin-eosin. Photographs were taken in inverted microscope Olympus MODEL IX51 equipped with Q Imaging QICAMIR Fast Digital 1394 CCD camera and Q Capture acquisition software. The area of single cells was calculated from the image of their planar surface using Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)). The surfaces of at least 1000 cells were analyzed manually

Table 1. PCR primer sequences.

Gene	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')	Accession no.
ANP	CCTGTGTACAGTGGCGGTGTC	CCTAGAAGCACTGCGGTCTC	NM_008725
Bax	AAAGTGCCGAGCTGATCA	AGCCACAAAGATGGTCACTGTCT	NM_007527.3
Bcl2	AGTTCCGTTGGGGTCATGTGTG	CCAGGATGCACCAGAGTG	NM_009741
BNP	CTGAAGGTGCTGTCCAGAT	GTCTTTTGTGAGGCCTTGG	NM_008726
CYP26A	CTAGGACTCTACCCACATGTCC	GTCTTCAGAGCAACCCGAAACC	NM_007811
GATA4	CACATGGGCACAGCAGCTCC	TTGGAGCTGGCCTGCGATGTC	NM_008092
OT	CCTACAGCGGATCTCAGACTGA	TCAGAGCCAGTAAGCAAGCA	NM_011025
OTR	CGACTCAGGACGAAGGTGGAGGA	AAGATGACCTTCATCATTTGTC	NM_001081147

Note: ANP, atrial natriuretic peptide; Bax, BCL2-associated X protein; Bcl2, B-cell leukemia/lymphoma 2; BNP, brain natriuretic peptide; CYP26A, cytochrome P450 26 A; GATA4, GATA binding protein 4; OT, oxytocin; OTR, oxytocin receptor; PCR, polymerase chain reaction. 18S (Ambion, lot no. 080700) was chosen for normalization because this gene showed consistent expression relative to other housekeeping genes among the treatment groups in our array experiments.

using Threshold, Watershed, and ROY Manager functions and are presented in μm^2 .

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gene expression was measured by relative quantitative RT-PCR as recently reported (Gutkowska et al. 2007). The oligonucleotide primers used for real-time quantitative PCR are listed in Table 1. The relative expression of the RT-PCR products was determined according to the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Gutkowska et al. 2007). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was chosen for normalization because we examined the stability of its expression between the experimental groups in relation to the amount of total cardiac RNA as well as 18S ribosomal RNA (AM 1716; Ambion, Life Technologies, Burlington, Ont., Canada) and results indicated that GAPDH was not affected by diabetes. As a control, melting point analysis revealed that each of the primer pairs amplified a single predominant product, and agarose electrophoresis demonstrated PCR products of single bands of predicted size.

Western blot analysis

Tissue samples were prepared by homogenization in modified RIPA buffer (1x PBS, 1% Igepal CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mg·mL⁻¹ PMSF, 0.001% aprotinin, 100 mM sodium orthovanadate, and 4% protease inhibitor), and maintained in constant agitation for 2 h at 4 °C and then centrifuged at 10 000g for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected and the protein concentration was determined by the modified Bradford assay. Twenty micrograms of total protein was applied to each well of a 10% SDS polyacrylamide gel and electrophoresed for 2 h at 130 V along with a set of molecular weight markers (RPN800; Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Que., Canada). The resolved protein bands were then transferred onto PVDF membranes (Hybond-C; GE Healthcare, Piscataway, N.J., USA) at 30 V for 2 h at room temperature using a transfer buffer (25 mmol·L⁻¹ Tris base, 192 mmol·L⁻¹ glycine, and 20% methanol). The transfer efficiency was verified by Ponceau S staining (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA). The blots were blocked for 1 h at room temperature with blocking buffer (10% nonfat milk in 10 mmol·L⁻¹ Tris, pH 7.5, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20). The blocking buffer was decanted and blots were incubated overnight at 4 °C with the following specific first antibodies: anti-OTR (sc-8102; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA), anti-endothelial nitric oxide synthase (anti-eNOS, sc-654; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bclx1 (sc-7195; Santa Cruz Biotechnology), anti-Caspase3 (sc-7148; Santa Cruz Biotechnology), anti-GATA4 (sc-25310; Santa Cruz Biotechnology), and anti-ALDH1A1 (ab6192, AbCAM, Burlington, Ont., Canada). After washing 3 times with TBS buffer (10 mmol·L⁻¹ Tris, pH 7.5, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20), the membranes were incubated with an appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody according to the manufacturer's protocol. As an internal control, blots were reprobed with an anti-GAPDH antibody (1:20 000, G9545; Sigma, St Louis, Mo., USA). The blots were

finally visualized using a chemiluminescence detection system (RPN2132, Amersham). Densitometric measurement of bands was performed by SCION Image software (Scion, Frederick, Md., USA). Each experiment was repeated twice to have reproducible results. The value of band intensity for the tested protein was divided by the corresponding value for the GAPDH band. The result for the left ventricle of the control group was selected arbitrarily as 1. Consequently, the values in other groups were presented as a magnitude of the control in arbitrary units.

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SE. Multiple comparisons were performed by 1-way ANOVA and Neuman-Keuls exact probability test (Graph Pad, San Diego, Calif., USA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

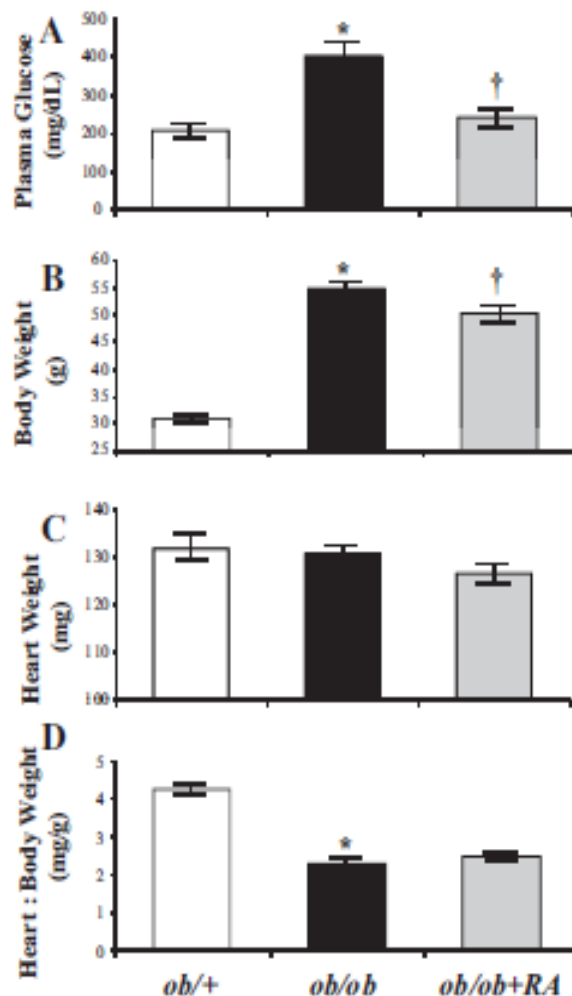
Effects of ATRA treatment on plasma glucose, obesity, and visceral fat

Daily food consumption was similar between untreated (5.4 ± 0.14 g per mouse) and ATRA-treated (5.1 ± 0.13 g per mouse) mice (Manolescu et al. 2010). Figure 1 shows the effects of ATRA treatment on plasma glucose and physical characteristics of the ob/ob mice. Ob/ob mice were hyperglycemic and ATRA treatment normalized plasma glucose ($p < 0.01$) levels (Fig. 1A). Body weight was considerably higher in ob/ob mice compared with the lean control mice. Treatment with ATRA resulted in a significant reduction in body weight gain in the treated versus untreated ob/ob mice (7.4% less; $p < 0.05$) (Fig. 1B). In contrast, heart weight (Fig. 1C) was not different between the 3 groups. Because of the greater body weight in ob/ob mice, the heart to body weight ratio was significantly lower in the ob/ob mice compared with lean controls (Fig. 1D). This parameter was not corrected by ATRA treatment. The reduction of body weight in ob/ob mice treated with ATRA involved significant reduction in the diameter of adipocytes dissected from visceral fat (Figs. 2A to 2D; $p < 0.01$).

Effects of ATRA treatment on RA metabolism, cell structure, and apoptosis in cardiomyocytes

ATRA treatment resulted in a 2-fold increase in CYP26A1 mRNA, a highly specific RA catabolic enzyme mediating the hydroxylation of ATRA in the heart (Fig. 3A). ATRA treatment also induced a 40% decrease in ALDH1A1 protein level, the enzyme that catalyzes the oxidation of retinaldehyde to endogenous RA (Fig. 3B). The size of the cardiomyocytes was similar in the ob/ob mice compared with the lean controls and were not affected by the 16-day ATRA treatment (Figs. 4A1, 4A2, and 4A3). Apoptosis of cells in cardiac sections was ~3-fold higher in the ob/ob mice compared with lean controls (Figs. 4B1 and 4B2; $p < 0.01$). ATRA treatment reduced apoptosis in ob/ob mice by 58% (Figs. 4B3 and 4B4). Increased collagen deposits were observed in the hearts of ob/ob mice (Figs. 4C2 and 4D2) compared with the lean controls

Fig. 1. Effects of retinoic acid (RA) treatment on plasma glucose level (A), body weight (B), heart weight (C), and heart/body weight ratio (D) in all-trans RA-treated mice (*ob/ob* RA⁺) compared with obese control (*ob/ob*; not treated (RA⁻)) and lean controls (*ob/+*). Values expressed as means \pm SE, $n = 6-8$ per group. *, $p < 0.05$, *ob/ob* (RA⁻) versus *ob/+*; †, $p < 0.05$, *ob/ob* RA⁺ compared with *ob/ob* (RA⁻).



(Figs. 4C1 and 4D1). ATRA treatment prevented the accumulation of collagen (Figs. 4C3 and 4D3). These observations were confirmed by measurement of collagen-positive areas using polarized light (Fig. 4D4). As illustrated in Fig. 5, ATRA treatment favourably affected cardiomyocyte genes involved in the regulation of apoptosis. The anti-apoptotic protein, Bcl-xL, was downregulated in *ob/ob* mice compared with the *ob/+* lean control mice and was normalized by ATRA treatment (Fig. 5A, $p < 0.01$). A downregulation of Bcl-2 mRNA, a pro-apoptotic marker, was also observed in *ob/ob* mice (Fig. 5B, $p < 0.01$) while the expression of Bax mRNA was similar compared with lean controls and both genes were not affected by ATRA treatment (Figs. 5C and 5D). However, an improvement in the expression ratio of anti-apoptotic Bcl-2/pro-apoptotic Bax genes was observed (Fig. 5D, $p < 0.05$). Furthermore, a significant increase of both caspase 3 proteins (the 32 kDa pro-caspase 3 and the active 17 kDa cleaved-caspase 3) was observed in the cardiomyocytes of *ob/ob* mice, a pro-apoptotic profile that was prevented by ATRA treatment (Fig. 5E and Fig. 5F; $p < 0.05$).

Effects of RA treatment on cardioprotective genes

Because diabetes in rodents is associated with a reduction in GATA4 levels in the heart (Kobayashi et al. 2007), we investigated

the expression of this transcription factor, which is important for cell survival in *ob/ob* mice. As illustrated in Fig. 6, *ob/ob* mice cardiomyocytes showed a downregulation of GATA4 protein (Fig. 6A) without any change in GATA4 transcripts (Fig. 6B). However, ATRA treatment was associated with an upregulation of GATA4 protein level and mRNA expression. Because *ob/ob* mice develop a cardiomyopathy in an age-dependent manner, it was logical to expect that deficiency of GATA4 would influence genes regulated by these factors in the heart, namely natriuretic peptides and eNOS. As presented in Fig. 6C, there was no significant change in the expression of ANP mRNA in the heart of all 3 groups. However, brain natriuretic peptide (BNP) mRNA (Fig. 6D) was significantly downregulated in hearts from *ob/ob* mice and was totally restored by ATRA treatment to levels observed in cardiomyocytes from lean controls. Consistent with an altered cardiac BNP mRNA in *ob/ob* mice, a significant downregulation was observed in the expression of OT mRNA that was totally prevented by ATRA treatment (Fig. 6E; $p < 0.05$). Furthermore, hearts from *ob/ob* mice also showed a downregulation of oxytocin receptor (OTR) transcripts and proteins that were upregulated by ATRA treatment (Fig. 6F and 6G; $p < 0.05$). Also consistent with an altered cardiac OT system in the heart of *ob/ob* mice, eNOS protein levels were lower compared with lean control mice. ATRA treatment of *ob/ob* mice increased eNOS protein level (Fig. 7, $p < 0.05$).

Discussion

The *ob/ob* mouse is a leptin deficient model characterized by severe obesity, insulin resistance, hyperinsulinemia, and hyperglycaemia (Mazumder et al. 2004). The mice develop cardiac dysfunctions over time (Schmieder and Messerli 1987; Van den Bergh et al. 2008) associated with a reduction in BNP synthesis (Bartels et al. 2010), collagen accumulation in the heart, and apoptosis of cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). In the present study, we demonstrate that ATRA treatment in *ob/ob* mice prevents fibrosis and collagen accumulation in the heart and apoptosis of cardiomyocytes, which are defects known to increase the risk for later development of cardiac dysfunction. Furthermore, these effects are associated with a decreased body weight gain and a significant improvement in glucose metabolism (Manolescu et al. 2010).

In the untreated *ob/ob* mice, average body weight was increased almost 2-fold by the time they reached the age of 12 weeks compared with lean control animals. The ATRA treatment resulted in a small but significant reduction in weight gain (7.4%; $p < 0.05$) in *ob/ob* mice. This effect was due, at least in part, to a reduction in the size of adipocytes in the visceral fat (Fig. 2). This was associated with lower fasting plasma glucose concentrations, indicating an improvement in glucose metabolism (Fig. 1A). This is consistent with our previous findings of ATRA treatment being associated with improvement in insulin sensitivity and glucose tolerance in *ob/ob* mice (Manolescu et al. 2010). The reduction in weight gain and a smaller adipocytes size in the visceral fat were observed despite no difference in food consumption in treated versus untreated animals, suggesting that ATRA treatment was associated with increased energy expenditure. Recently, ANP and BNP were described as heart hormones influencing brown fat metabolism (Whittle and Vidal-Puig 2012) and acting via several mechanisms (e.g., cGMP/PKG/p38MAPK, PGC-1 α , UCP1) to induce a brown fat thermogenic program in mouse and human white adipocytes (Bonet et al. 2013; Bordinchia et al. 2012). This observation suggests that the heart can be considered as playing a role in the adipose tissue biology. This is consistent with the observation that transgenic mice over-expressing BNP are lean and resistant to diet-induced obesity, presumably because of reduction in fat tissue and increased lipolysis (Miyashita et al. 2009). Furthermore, it has been observed in obese rodents that RA treatment increased lipolysis, resulting in a decrease in body fat content (Bonet et al. 2012) and an increased in peripheral insulin sensitivity (Lundgren et al.

Fig. 2. Effect of retinoic acid (RA) treatment on visceral adipocytes size in all-trans RA-treated mice (*ob/ob* RA⁺) compared with obese control (*ob/ob*) not treated (RA⁻) and lean controls (*ob/+*) (A). The surface area of at least 1000 cells from each mouse was used to calculate average value. Representative pictures of adipocytes in sections isolated from visceral fat in *ob/+* mice (B), in *ob/ob* RA⁻ (C), and in *ob/ob* RA⁺ (D). Scale bar = 100 μ m. Results are expressed as means \pm SE; $n = 8$ per group. *, $p < 0.001$, *ob/ob* (RA⁻) compared with *ob/+*; †, $p < 0.01$, *ob/ob* RA⁺ compared with *ob/ob* (RA⁻).

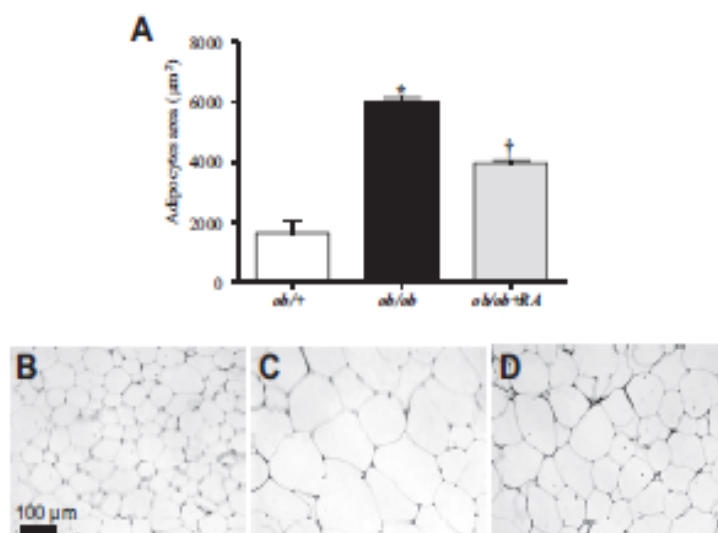
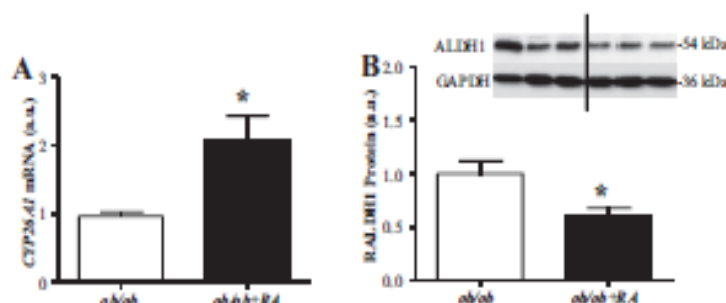


Fig. 3. Effects of retinoic acid (RA) treatment on the expression of CYP26A1 (A) and the protein level of ALDH1A1 (B) in cardiomyocytes of all-trans RA-treated mice (*ob/ob* RA⁺) compared with obese control (*ob/ob*) not treated (RA⁻) and lean controls (*ob/+*) (A). Bars show the mean \pm SE; $n = 6$ per group. *, $p < 0.05$.



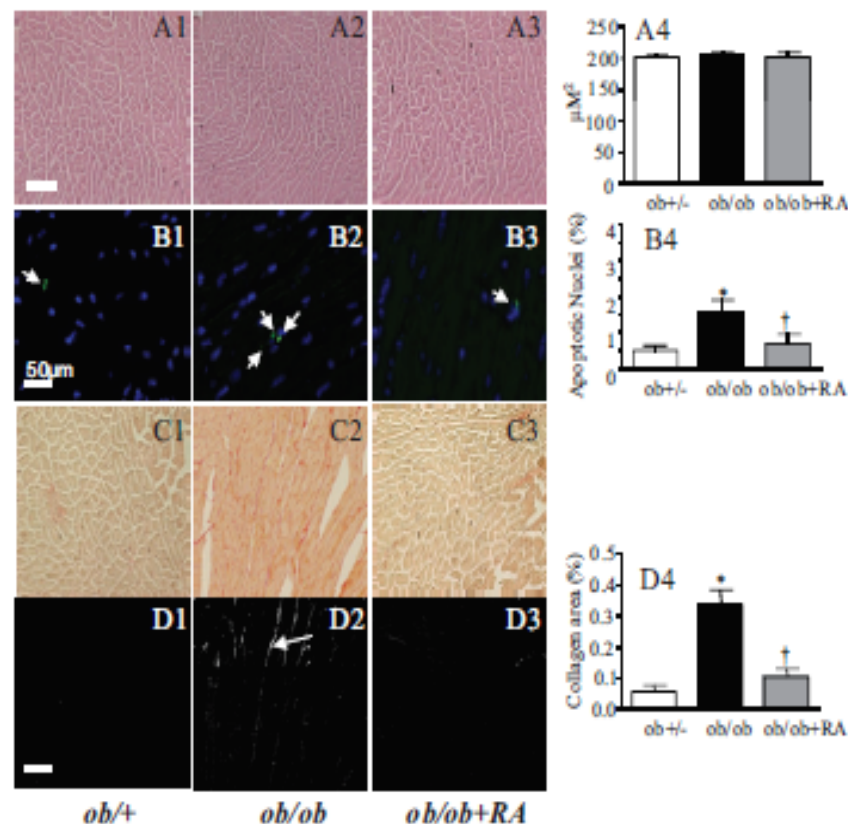
2007). There are also evidences that RA suppresses adipogenesis in vivo and contributes to the ability of the hormone to counteract diet-induced obesity (Berry et al. 2012) and genetic obesity as reported in the present study. There are also evidences that adipogenesis depends on endogenous production of RA by ALDH1A1 enzymes (Reichert et al. 2011). However, Reichert et al. (2011) showed that exogenously supplied RA to C57/BL6 mice resulted in ALDH1A1 inhibition and suppression of fat formation. Similarly, in the present study, it was observed that ATRA treatment was associated with a lower expression of ALDH1A1 in the heart of *ob/ob* mice; however, the significance of this potential feedback mechanism in the heart is difficult to explain without a profound separate investigation.

The level of natriuretic peptides in plasma and cardiac tissue is known to be reduced in obesity, diabetes, and insulin-resistant states in both the mouse models as well as in humans (Moro et al. 2004; Moro 2013). BNP is generally viewed as a cardioprotective hormone that prevents pathological hypertrophy, fibrosis, and apoptosis of cardiomyocytes (Tamura et al. 2000). In this study we have observed that the low expression of BNP seen in the heart of *ob/ob* mice was normalized by ATRA treatment. It is suggested that the changes related to BNP deficit are reversed, at least in part, through the action of ATRA. Indeed, our recent study in *db/db* mice deficient in leptin receptor indicated that the enhancement of BNP significantly reduced the development of obesity, glucose

intolerance, and insulin resistance as well as some structural and functional changes of the heart (Plante et al. 2014). BNP treatment decreased accumulation of fat and adipocytes diameter associated with a decrease in weight gain, promoted insulin sensitivity, and improved glycaemic control. It was also observed that the hyperphagic response to BNP treatment with the appearance of brown-like adipocytes expressing UCP1 promotes cellular energy dissipation as heat. The cardioprotective effects of BNP were attributed to the inhibition of cardiomyocyte apoptosis, myocardial fibrosis, and the cardiac hypertrophy as well as normalization of cardiac AMP-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase activities. The anti-fibrotic activity of BNP is supported by the observation that cardiac fibrosis is a dominant feature in mice lacking BNP (Tamura et al. 2000). Beneficial effects of RA treatment on cardiac fibrosis have also been reported in hypertensive rats (Li et al. 2003), in experimental myocardial infarction (Paiva et al. 2005), and in aortic-banded rats (Choudhary et al. 2008b). Furthermore, angiotensin II-induced cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis are inhibited by ATRA treatment (He et al. 2006), indicating that RA-mediated cell signalling is involved in regulating cardiac fibrosis.

In the adult heart, the transcription factor GATA4 has been shown to have both anti-fibrotic and anti-apoptotic effects (Huang

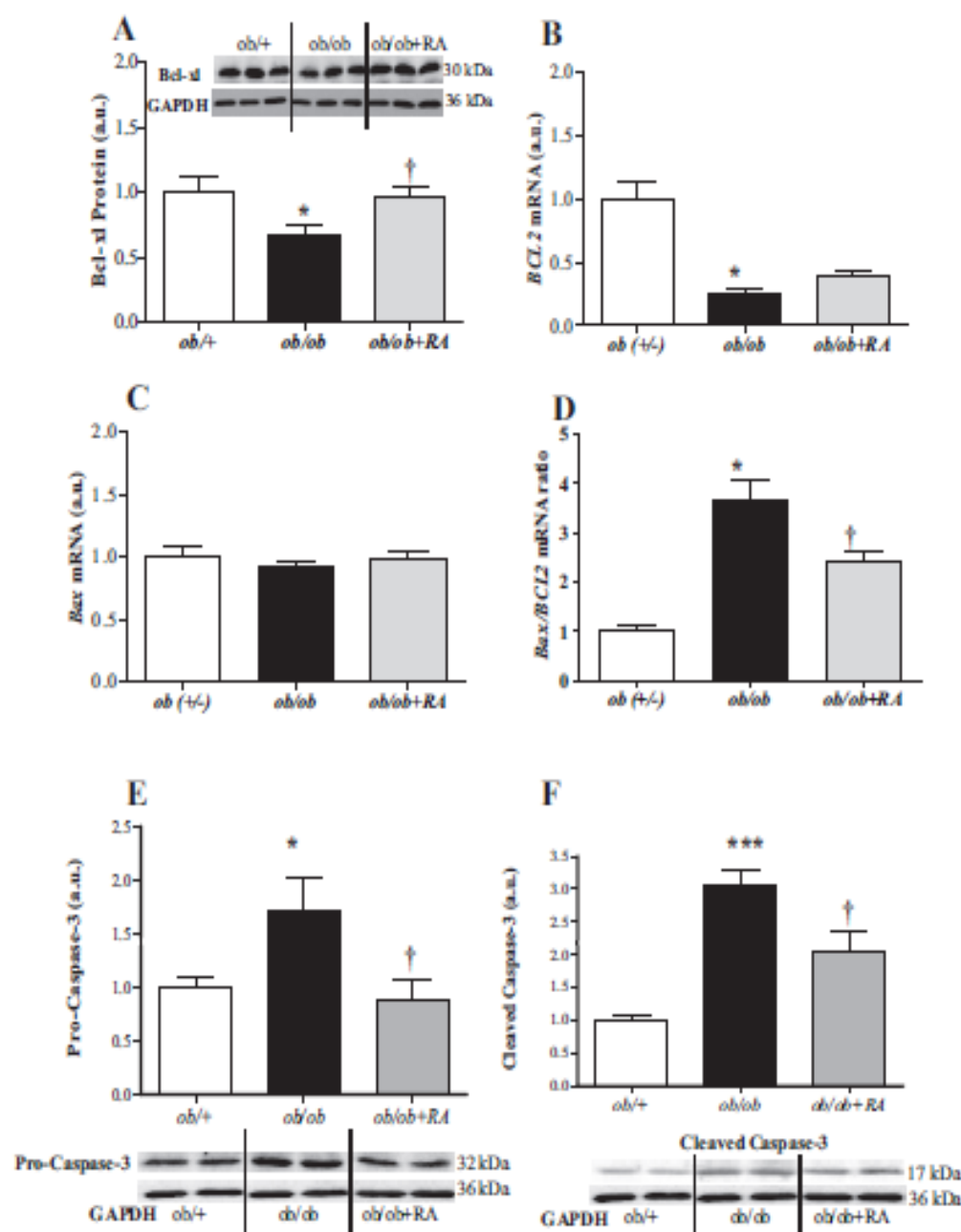
Fig. 4. (A) Ventricular cross-sections as follows: lean control mice (*ob/+*) section (A1), section of obese control (*ob/ob*) not treated (*RA*⁻) mice (A2), section of all-trans *RA* treated (*ob/ob RA*⁺) mice (A3) and subsequent surface area of cardiomyocytes (A4) (*n* = 6–8). (B) Apoptotic nuclei in cardiac sections of lean control (*ob/+*) mice (B1), *ob/ob* (*RA*⁻) mice (B2), *ob/ob RA*⁺ mice (B3) and their subsequent quantitative graph bars (B4) (*n* = 4). (C) Sirius red staining collagen deposit (red colour; dark shading in print version) in cardiac sections of lean control (*ob/+*) mice (C1), *ob/ob* (*RA*⁻) mice (C2), *ob/ob RA*⁺ mice (C3), and their quantitative analysis of collagen deposits under double refraction, respectively (D1, D2, D3). (D4) Significant elevation of cardiac collagen deposits in *ob/ob* (*RA*⁻) mice versus lean control (*ob/+*) mice and *ob/ob RA*⁺ group (*n* = 3); *p* < 0.05, *ob/ob* (*RA*⁻) compared with *ob/+*; †, *p* < 0.05, *ob/ob RA*⁺ versus *ob/ob* (*RA*⁻). Values are means ± SE. Scale bars = 50 µm. *RA*, retinoic acid; µM², µmol·L⁻².



et al. 2008) by stimulating the production of ANP, BNP, and Bcl-2, respectively. The reduction in GATA4 protein content seen in hearts of *ob/ob* mice is consistent with other models of hyperglycaemia, including *db/db* mice and streptozotocin-treated rats (Kobayashi et al. 2007). The decreased expression of GATA4 is suggested to occur as a result of high-circulating glucose levels (Kobayashi et al. 2007); this is consistent with observations in other models of diabetes where the synthesis of BNP as well as anti-apoptotic genes are reduced in cardiomyocytes (Cao and Gardner 1995). In the present study, ATRA treatment of *ob/ob* mice attenuated the hyperglycemia, normalized GATA4 protein content in the heart, and increased the synthesis of GATA4-related peptides (Figs. 6D–6G), including BNP and Bcl-2. The decrease in collagen formation and rate of apoptosis of cardiomyocytes in hearts of RA-treated obese mice is consistent with the upregulation of GATA4 and downstream protective genes. This protective role of GATA4 is supported by the observation in experimental myocardial infarction in rats, which is that the peri-infarct intramyocardial delivery of GATA4 gene via adenoviral vector prevented adverse postinfarction heart remodelling through myocardial angiogenesis, anti-apoptosis, and stem cell recruitment (Rysa et al. 2010). Reports have also demonstrated that GATA4 synthesis can be induced by RA treatment (Arceci et al. 1993), further implicating a role for RA in the synthesis of GATA4-related peptides in the prevention of cardiac apoptosis and fibrosis.

ATRA treatment was associated with a normalization of OT and OTR, which are found to be downregulated in nontreated *ob/ob* mouse hearts (Figs. 6E, 6F, 6G). As previously reported, RA treatment of rats at day 21 of gestation produced a significant 2- to 3-fold increase of cardiac OT protein concentration and OT mRNA levels in the fetal heart (Jankowski et al. 2004). Further analysis of P19 embryonic carcinoma cells indicated that GATA4 is a component of the ATRA-mediated cardiogenic pathway linked to cardiomyocytes differentiation stimulated by OT (Jankowski et al. 2004). This is consistent with the presence of GATA4-regulated element on OTR gene promoter (Uchida et al. 2007). Recent studies revealed important central and peripheral actions of OT in obesity (Deblon et al. 2011; Zhang and Cai 2011), and rats treated with OT had smaller adipocytes compared with control animals (Eckertova et al. 2011). An increase in OT expression following ATRA treatment in hearts of *ob/ob* mice is clearly cardioprotective based of earlier work indicating that OT increases antioxidant markers (Szeto et al. 2008), activates mitochondrial *K_{ATP}* channels (Alizadeh et al. 2010), inhibits cell death pathways via phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway (Kobayashi et al. 2009), generates nitric oxide production (Danalache et al. 2007), confers anti-inflammatory protection (Jankowski et al. 2010b), and stimulates natriuretic peptides production (Gutkowska et al. 1997). Furthermore, OT activates signalling pathways in cardiac muscles that overlap with those of insulin (Florian et al. 2010), promoting glucose uptake,

Fig. 5. Effects of retinoic acid (RA) treatment on Bcl-x1 protein level (A), BCL2 mRNA (B), BAX mRNA (C), BAX/BCL2 mRNA ratio (D), as well as on the protein level of pro-caspase-3 (E) and caspase-3 (F) in cardiomyocytes of all-trans RA treated (*ob/ob* RA⁺) compared with obese control (*ob/ob*) not treated (RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Bars show the mean \pm SE; $n = 6$ for each group. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ *ob/ob* (RA⁻) compared with *ob/+*; †, $p < 0.05$, *ob/ob* RA⁺ compared with *ob/ob* (RA⁻).



and possibly indirectly mediating the effect of RA on plasma glucose levels in obese mice.

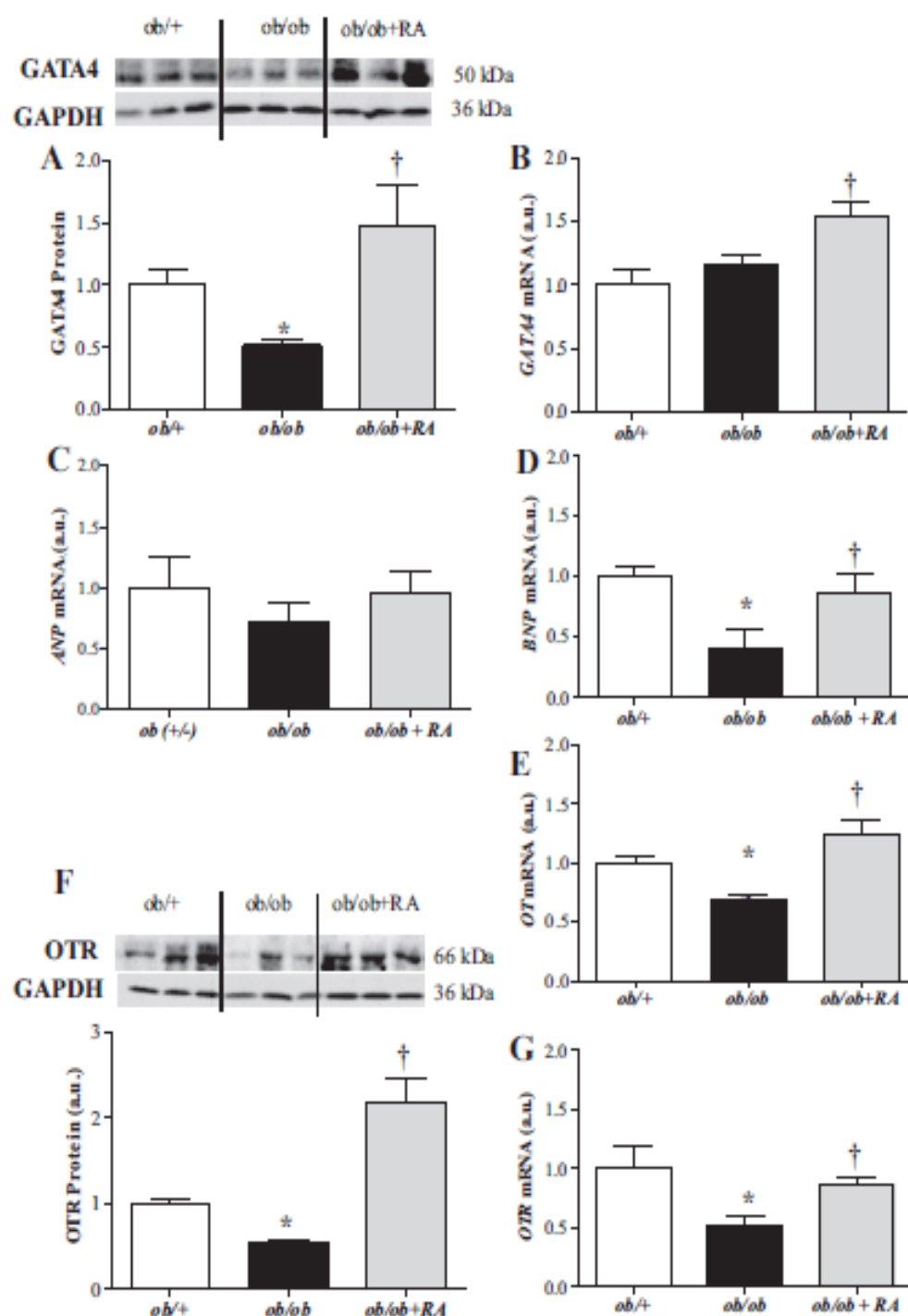
Another stimulator of the cGMP/PKG-pathway is nitric oxide-produced mainly in the heart by eNOS and involved in the cardiovascular system cell cycle (Ignarro et al. 1999). Our study shows that eNOS expression is reduced in *ob/ob* mice and that ATRA treatment reversed this to level comparable to control hearts. It has been demonstrated that ATRA increased nitric oxide production by eNOS phosphorylation through RAR-mediated PI3K/Akt pathway in endothelial cells and possibly plays beneficial roles in vascular endothelium (Urano et al. 2005). Furthermore, others have shown that ATRA treatment also increases the PI3K/Akt

pathway in endothelial cells (Urano et al. 2005), which is a pathway found to be decreased in *ob/ob* mice (Trivedi et al. 2008).

Study limitations

Our investigations demonstrate that the mechanism of action of ATRA can include direct actions on the heart. However, the functional aspect of the cardiac ATRA receptors was not addressed. In this respect the hypothesis of Reichert et al. (2011) need to be considered. Accordingly, the ATRA has the highest affinity for binding to RAR, which activates RAR heterodimerization with RXR and this complex binds to a RA response element in target genes, which may include OTR and natriuretic peptides as sug-

Fig. 6. Effects of retinoic acid (RA) treatment on GATA4 protein (A) and mRNA (B) levels, ANP mRNA (C), BNP mRNA (D), OT mRNA (E), and OTR protein (F) and mRNA (G) relative change in cardiomyocytes of *ob/ob* RA⁺ compared with obese control *ob/ob* (RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Bars show the mean \pm SE; $n = 5-6$ animals in each group. *, $p < 0.05$, *ob/ob* (RA⁻) compared with *ob/+*; †, $p < 0.05$, *ob/ob* RA⁺ compared with *ob/ob* (RA⁻).



gested in Fig. 8. Furthermore, to better address the aspect of gene regulation, it would be important to perform the molecular study of ATRA regulation in cardiomyocytes isolated from adult *ob/ob* mice. It is important to examine if the ATRA effect on eNOS phosphorylation reported previously (Urano et al. 2005) is also observed in cardiomyocytes of *ob/ob* mice. More investigations in

various fat tissue topology and obese mice models (e.g., *ob/ob*, *db/db*) may be useful to address whether enhancing and (or) inducing "fat browning process" pass mainly through increasing natriuretic peptides (BNP, ANP) levels or if a direct action of RA treatment on some specific genes of brown fat metabolism (e.g., UCP1, PGC-1 α) is also involved (Bonnet et al. 2012).

Fig. 7. The effect of retinoic acid (RA) treatment on eNOS protein level in cardiomyocytes of alltrans RA treated (*ob/ob* RA⁺) compared with obese control (*ob/ob*) not treated (RA⁻) and lean controls (*ob/+*). Bars show the mean \pm SE; $n = 5-6$ animals in each group. *, $p < 0.05$, *ob/ob* (RA⁻) compared with *ob/+*; †, $p < 0.05$, *ob/ob* RA⁺ compared with *ob/ob* (RA⁻).

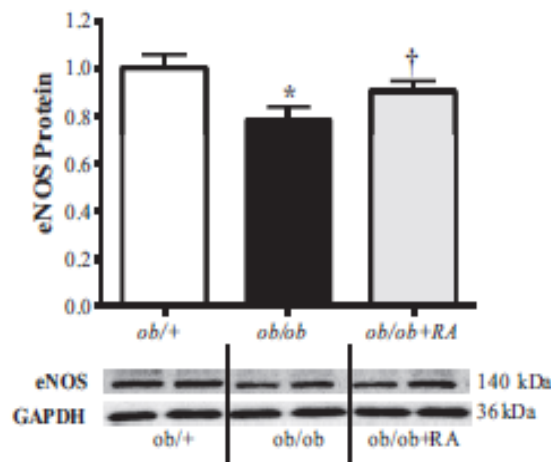
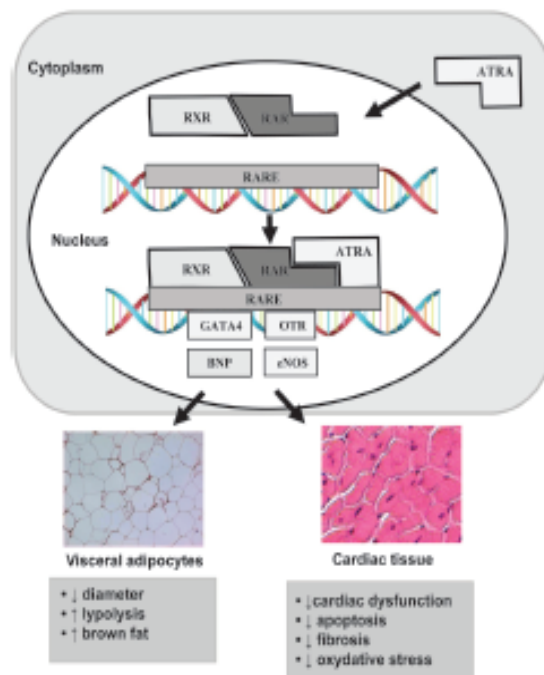


Fig. 8. Alltrans-retinoic acid (ATRA) acts by binding to the retinoic acid receptor (RAR), which is bound to DNA as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) in regions called retinoic acid response elements (RARE). This allows the complex to regulate the rate of genes transcription including transcription factor GATA4, oxytocin receptor (OTR), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and brain natriuretic peptide (BNP). BNP released from the heart should favourably regulate metabolism of adipocytes.



Conclusion

RA treatment in the *ob/ob* mice, a model of obesity, insulin resistance, and hyperglycaemia, resulted in decreased weight gain, lower visceral adipocytes size, and improvement in glucose

tolerance. These beneficial phenotypes were associated with normalization of BNP, OT, and OTR genes expression (mRNA) and of GATA4, OTR, and eNOS protein level in cardiomyocytes as well as an upregulation of the anti-apoptotic genes and a downregulation of the pro-apoptotic genes. These effects resulted in a decrease in collagen accumulation and a reduction in apoptosis of cardiomyocytes. The present findings further support the concept of the GATA4-oxytocin-natriuretic peptide cardioprotective system as a key player in the prevention of abnormal cardiac remodelling associated with obesity and diabetes.

Conflict of interest statement

D.-C. Manolescu, M. Jankowski, B. Danalache, D. Wang, T.I. Broderick, J.-L. Chiasson, and J. Gutkowska have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP-53217, NET Program) and the Canadian Heart and Stroke Foundation (CHSF) as grants to J.G. and M.J., and by the Office of Research and Sponsored Programs of Midwestern University to T.I.B. D.-C. Manolescu is a fellow of Québec FRQS (05.2012) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012), and fellow of Banting and Best/Canadian Institute of Health Research (CIHR 01.2014/12.2015) PhD Scholarship.

References

- Alizadeh, A.M., Faghihi, M., Sadeghipour, H.R., Mohammadghasemi, F., Imani, A., Houshmand, F., and Khor, V. 2010. Oxytocin protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via pathway involving mitochondrial ATP-dependent potassium channel. *Peptides*, 31(7): 1341-1345. doi:10.1016/j.peptides.2010.04.012. PMID:20417240.
- Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Wilson, D.B. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol. Cell. Biol.* 13(4): 2235-2246. PMID:8455608.
- Barouch, L.A., Gao, D., Chen, L., Miller, K.L., Xu, W., Phao, A.C., et al. 2006. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ. Res.* 98(1): 119-124. PMID:16339484.
- Bartels, E.D., Nielsen, J.M., Bisgaard, L.S., Goetze, J.P., and Nielsen, L.B. 2010. Decreased expression of natriuretic peptides associated with lipid accumulation in cardiac ventricle of obese mice. *Endocrinology*, 151: 5218-5225. doi:10.1016/j.bbalep.2010.06.001. PMID:21669299.
- Berry, D.C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C.M., and Noy, N. 2012. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes*, 61(5): 1112-1121. doi:10.2337/db11-3620. PMID:22396202.
- Bhat, P.V., and Iacrob, A. 1991. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69(6): 826-830. doi:10.1139/y91-124. PMID:1913328.
- Boner, M.L., Ribot, J., and Palou, A. 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1821(1): 177-189. doi:10.1016/j.bbalep.2010.06.001. PMID:21669299.
- Boner, M.L., Oliver, P., and Palou, A. 2013. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 1831(5): 969-985. doi:10.1016/j.bbalep.2012.12.002. PMID:23246573.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., et al. 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* 122(3): 1022-1036. doi:10.1172/JCI59701. PMID:22387324.
- Choudhary, R., Baker, K.M., and Pan, J. 2008a. All-trans retinoic acid prevents angiotensin II- and mechanical stretch-induced reactive oxygen species generation and cardiomyocyte apoptosis. *J. Cell Physiol.* 215(1): 172-181. doi:10.1002/jcp.21287. PMID:17941088.
- Choudhary, R., Palm-Leis, A., Scott, R.C., III, Galeris, R.S., Rachut, E., Baker, K.M., and Pan, J. 2008b. All-trans retinoic acid prevents development of cardiac remodeling in aortic banded rats by inhibiting the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294(2): H633-H644. doi:10.1152/ajpheart.01301.2007. PMID:18156191.
- Danilache, B.A., Paquin, J., Donghao, W., Geygozcyk, R., Moore, J.C., Mummery, C.L., et al. 2007. Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis. *Stem Cells*, 25(3): 679-688. PMID:1718963.
- Deblon, N., Veyrat-Durebex, C., Bourgois, L., Caillon, A., Bussier, A.L., Perrosio, S., et al. 2011. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. *PLoS ONE*, 6(9): e25565. doi:10.1371/journal.pone.0025565. PMID:21980491.

- Eckertova, M., Ondrejickova, M., Kiskova, K., Zorad, S., and Jezova, D. 2011. Subchronic treatment of rats with oxytocin results in improved adipocyte differentiation and increased gene expression of factors involved in adipogenesis. *Brit. J. Pharmacol.* 162(2): 452–463. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.03037.x. PMID:20846187.
- Florian, M., Jankowski, M., and Gutkowska, J. 2010. Oxytocin increases glucose uptake in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*, 151(2): 482–491. doi:10.1210/en.2009-0624. PMID:20080422.
- Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H.H., and McCann, S.M. 1997. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(23): 11704–11709. doi:10.1073/pnas.94.23.11704. PMID:9326674.
- Gutkowska, J., Paquette, A., Wang, D., Lavoie, J.-M., and Jankowski, M. 2007. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(3): R267–R275. doi:10.1152/ajp Regul.00071.2007. PMID:17456880.
- Gutkowska, J., Broderick, T.L., Bogdan, D., Wang, D., Lavoie, J.M., and Jankowski, M. 2009. Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: possible implications in cardiomyopathy. *J. Physiol.* 587(Pt 19): 4725–4736. doi:10.1113/jphysiol.2009.176461. PMID:19765071.
- He, Y., Huang, Y., Zhou, L., Lu, L.M., Zhu, Y.C., and Yao, T. 2006. All-trans retinoic acid inhibited angiotensin II-induced increase in cell growth and collagen secretion of neonatal cardiac fibroblasts. *Acta Pharmacol. Sin.* 27(4): 423–429. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00296.x. PMID:16539842.
- Hindie, A.K., Edwards, C., McCaffrey, T., Fu, S., and Brody, F. 2010. Identification of cardiovascular genes in omentum from morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Int. J. Obes. (Lond.)*, 34(6): 1020–1027. doi:10.1038/sj.ijo.2010.23. PMID:20557321.
- Huang, Y., Wright, C.D., Kobayashi, S., Healy, C.L., Elgethun, M., Cypher, A., et al. 2008. GATA4 is a survival factor in adult cardiac myocytes but is not required for α A-adrenergic receptor survival signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295(2): H699–H707. doi:10.1152/ajpheart.01204.2007. PMID:18552557.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. 1999. Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardio. Pharmacol.* 34(6): 879–886. doi:10.1097/00005344-199912000-00016. PMID:10598333.
- Jankowski, M., Danalache, B., Wang, D., Bhat, P., Hajjar, F., Marcinkiewicz, M., et al. 2004. Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(25): 13074–13079. doi:10.1073/pnas.0405324101. PMID:1539617.
- Jankowski, M., Wang, D., Danalache, B., Gangal, M., and Gutkowska, J. 2010a. Cardiac oxytocin receptor blockade stimulates adverse cardiac remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299(2): H265–H274. doi:10.1152/ajpheart.00487.2009. PMID:20671291.
- Jankowski, M., Bissonnaux, V., Gao, L., Gangal, M., Wang, D., Danalache, B., et al. 2010b. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 105(2): 205–218. doi:10.1007/s00395-009-0076-5. PMID:20012748.
- Kobayashi, H., Yasuda, S., Bao, N., Hwasa, M., Kawamura, I., Yamada, Y., et al. 2009. Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54(6): 510–519. doi:10.1097/FJC.0b013e3181b6a0c2. PMID:19755919.
- Kobayashi, S., Mao, K., Zheng, H., Wang, X., Patterson, C., O'Connell, T.D., and Liang, Q. 2007. Diminished GATA4 protein levels contribute to hyperglycemia-induced cardiomyocyte injury. *J. Biol. Chem.* 282(30): 21945–21952. doi:10.1074/jbc.M703048200. PMID:17525155.
- Lü, L., Yao, T., Zhu, Y.Z., Huang, G.Y., Cao, Y.X., and Zhu, Y.C. 2003. Chronic all-trans retinoic acid treatment prevents medial thickening of intramyocardial and intracranial arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285(4): H1370–H1377. PMID:12755633.
- Lundgren, M., Srensson, M., Lindmark, S., Renström, F., Ruge, T., and Eriksson, J.W. 2007. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperlipidaemia'. *Diabetologia*, 50(3): 625–633. doi:10.1007/s00125-006-0572-1. PMID:1726279.
- Manolescu, D.C., Sima, A., and Bhat, P.V. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J. Nutr.* 140(2): 311–316. doi:10.3945/jn.109.115147. PMID:20032483.
- Mazumder, P.K., O'Neill, B.T., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., et al. 2004. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*, 53(9): 2366–2374. doi:10.2337/diabetes.53.9.2366. PMID:15331547.
- Miyashita, K., Itoh, H., Tsujimoto, H., Tamura, N., Fukunaga, Y., Sone, M., et al. 2009. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes*, 58(12): 2880–2892. doi:10.2337/db09-0393. PMID:19690065.
- Moro, C. 2013. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 16(6): 645–649. doi:10.1097/MCO.0b013e318283650ed.
- Moro, C., Crampes, F., Seignenes, C., De Glisezinski, I., Galinzy, J., Thalamas, C., et al. 2004. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J.* 18(7): 908–910. doi:10.1096/fj.03-1086jfe. PMID:15033935.
- Myhre, A.M., Takahashi, N., Blohmoff, R., Brethman, T.R., and Norum, K.R. 1996. Retinoylation of proteins in rat liver, kidney, and lung in vivo. *J. Lipid Res.* 37(9): 1971–1977. PMID:8895063.
- Paiva, S.A., Matsubara, L.S., Matsubara, R.B., Minicucci, M.F., Azevedo, P.S., Campana, A.O., and Zornoff, L.A. 2005. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J. Nutr.* 135(10): 2326–2328. PMID:16771990.
- Pan, J., and Baker, K.M. 2007. Retinoic acid and the heart. *Vitam. Horm.* 75: 257–283. doi:10.1016/S0083-6729(06)75010-5. PMID:17368339.
- Plante, E., Menaaouar, A., Danalache, B.A., Broderick, T.L., Jankowski, M., and Gutkowska, J. 2014. Treatment with brain natriuretic peptide prevents the development of cardiac dysfunction in obese diabetic db/db mice. *Diabetologia*, 57(6): 1257–1267. doi:10.1007/s00125-014-3201-4. PMID:24595856.
- Reichert, B., Yasmeen, R., Jayakumar, S.M., Yang, F., Thomas, T., Alder, H., et al. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences deposit-specific fat formation. *Mol. Endocrinol.* 25(5): 799–809. doi:10.1210/me.2010-0465. PMID:21436255.
- Rysa, J., Tenhunen, O., Serpi, R., Soini, Y., Nemer, M., Leskinen, H., and Ruskoaho, H. 2010. GATA-4 is an angiogenic survival factor of the infarcted heart. *Circ. Heart Failure*, 3(3): 440–450. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.889642. PMID:20200331.
- Schmieder, R.E., and Messerli, F.H. 1987. Obesity hypertension. *The Medical Clinics of North America*, 71(5): 993–1001. PMID:3306213.
- Szeto, A., Narion, D.A., Mendez, A.J., Dominguez-Bendala, J., Brooks, L.G., Schneiderman, N., and McCabe, P.M. 2008. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295(4): E3495–E3501. doi:10.1152/ajpendo.90718.2008. PMID:18940936.
- Tamura, N., Ogawa, Y., Chasho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., et al. 2000. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(8): 4239–4244. doi:10.1073/pnas.070374097. PMID:10737768.
- Trivedi, P., Yang, R., and Barouch, L.A. 2008. Decreased p38 α catalytic activity accompanies increased myocyte apoptosis and cardiac hypertrophy in leptin deficient ob/ob mice. *Cell Cycle*, 7(5): 560–565. doi:10.4161/cc.7.5.5529. PMID:18239469.
- Uchida, S., Fuke, S., and Tsukahara, T. 2007. Upregulations of Gata4 and oxytocin receptor are important in cardiomyocyte differentiation processes of P19CL6 cells. *J. Cell. Biochem.* 100(3): 629–641. doi:10.1002/jcb.21094. PMID:16960874.
- Urano, A., Sugawara, A., Kanatsuka, H., Kagechika, H., Saito, A., Sato, K., et al. 2005. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation*, 112(5): 727–736. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.304.500959. PMID:16043647.
- Van den Bergh, A., Vanderper, A., Vangheluwe, P., Desjardins, F., Nevelsteen, I., Verreth, W., et al. 2008. Dyslipidaemia in type II diabetic mice does not aggravate contractile impairment but increases ventricular stiffness. *Cardiovasc. Res.* 77(2): 371–379. doi:10.1093/cvr/cvm001. PMID:18006401.
- Wang, H.J., Zhu, Y.C., and Yao, T. 2002. Effects of all-trans retinoic acid on angiotensin II-induced myocyte hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 92(5): 2162–2168. PMID:11960970.
- Whittle, A.J., and Vidal-Puig, A. 2012. NPs – heart hormones that regulate brown fat? *J. Clin. Invest.* 122(3): 804–807. doi:10.1172/JCI62595. PMID:22307322.
- Wu, J., Gattini, M., Cheng, T., and Gardner, D.G. 1996. 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ and retinoic acid antagonize endothelial-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 97(7): 1577–1588. doi:10.1172/JCI14582. PMID:8601621.
- Zhang, G., and Cai, D. 2011. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301(5): E1004–E1012. doi:10.1152/ajpendo.00196.2011. PMID:21828335.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505): 425–432. doi:10.1038/372425a0. PMID:7984236.
- Zhou, M.D., Sucov, H.M., Evans, R.M., and Chien, K.R. 1995. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(16): 7391–7395. doi:10.1073/pnas.92.16.7391. PMID:7638203.



June 5-7, 2014

Sheraton Hotel Newfoundland
St. John's, NL



Canadian Nutrition Society
Société canadienne de nutrition

April 2, 2014

Dear Daniel-Constantin Manolescu,

We are pleased to inform you that your abstract entitled - « **Natriuretic peptide and other cardio- protective genes are stimulated by vitamin A (retinoic acid), preventing apoptosis and fibrosis in obese-diabetic mice heart** » - has been selected as one of **eight (8) finalists** for the **POSTER COMPETITION** at the CNS-SCN Annual Meeting to be held in St. John's, NL.

Your abstract was ranked very highly (1st in the posters) in the initial review...congratulations!
Additional judging of your poster will take place on Friday, June 6th 2014 (starting at 11:30 am) at the CNS Annual Meeting in St. John's, NL.

The competition was of high calibre with 55 abstracts and the judges undertook a substantial task in selecting the **8 finalists**. You should be very proud of the effort you put forward in preparing a high quality abstract. All finalists will be recognized with a certificate at the CNS Awards Banquet on Saturday, June 7th 2014 **at 7 pm**. You will receive a complimentary ticket to the Awards Banquet.

Your abstract will be published in the in the Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (APNM) Journal. Please note that at this point, no further changes can be made to your abstract as the version printed in the journal must be that which was reviewed by the committee.

Close to 100 abstracts were submitted for the 2014 CNS-SCN Annual Meeting. An outstanding number of high quality submissions were submitted at the close of the abstract deadline. Thank you to everyone for considering CNS to showcase your research. If you have any questions, please contact Lindsay Robinson at lrobinso@uoguelph.ca. Otherwise, see you in St. John's!

Sincerely,

Lindsay Robinson, PhD, Associate Professor, Human Health/Nutritional Sciences, University of Guelph
CNS Abstract Chair, Awards Co-Chair, and Member of Conference Committee

NB – Consolidated information from 2014 CNS Annual Meeting official e-mail information –DCM IV 2014

2175 Sheppard Avenue East, Suite 310, Toronto, Ontario M2J 1W8
Tel: (416) 491-2886 • Fax: (416) 491-1670
E-mail: info@cscn-scnc.ca • Website: www.cscn-scns.ca

This article : *All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice* - Manolescu DC, Jankowski M, Danalache BA, Wang D, Broderick TL, Chiasson JL, Gutkowska J.

Appl Physiol Nutr Metab. 2014 Oct;39(10):1127-36. doi: 10.1139/apnm-2014-0005. Epub 2014 Apr 30.

was cited in 9 publications, from 2014 to 2017

- Effects of recombinant human brain natriuretic peptide on the prognosis of patients with acute anterior myocardial infarction...-Zhi-Lin Miao, Ai-Jie Hou, Hong-Yun Zang, Ru-Gang Huang, Zhan-Quan Li
 - All-Trans Retinoic Acid supplementation prevents cardiac fibrosis and cytokines induced by Methylglyoxal-Umadevi Subramanian, Devipriya Nagarajan
 - Association of Serum Retinoic Acid With Risk of Mortality in Patients With Coronary Artery Disease-Yan Liu, Hongeng Chen, Di Mu, Di Li, Min Xia
 - Oxytocin and cardioprotection in diabetes and obesity-Marek Jankowski, Tom L. Broderick, Jolanta Gutkowska
 - Effects of Vitamin A Deficiency in the Postnatal Mouse Heart - Role of Hepatic Retinoid Stores-Mary Ann Asson-Batres, Sergey V Ryzhov, Oleg Tikhomirov, Christine W Duarte, Douglas B Sawyer
 - Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental...-Wenqin Xiao, Weiliang Jiang, Jie Shen, Guojian Yin, Rong Wan
 - A pill to replace physical activity?-M. Saubade, S. Norrenberg, C. Besson, J. Thornton, F. Amati
 - Retinoic acid promotes primary fetal alveolar epithelial type II cell proliferation and differentiation to alveolar epithelial type I cells-Rui-Wei Gao, Xiang-Yong Kong, Xiao-Xi Zhu, Guo-Qing Zhu, Xiu-Xiang Liu
-
- Cardiac Dysfunction in β -Carotene-15,15'-Dioxygenase-Deficient Mice is Associated with Altered Retinoid and Lipid Metabolism.-Sueng-Ah Lee, Hongfeng Jiang, Chad M Trent, Jason J Yuen, William S

Publication 4 : La RBP4 dans l'obésité, la RI et le diabète de type 2 – chapitre 2 publié

« Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance » -CRC Press 2014

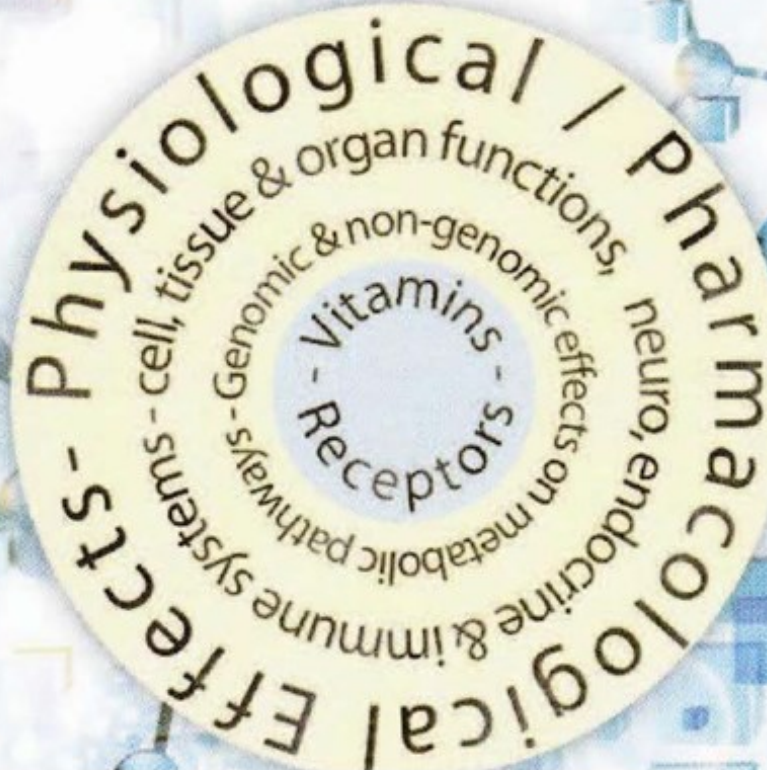
Durant les travaux de notre thèse nous avons coécrit et publié, sous la forme d'un chapitre de livre, un article de revue sur la RBP4 dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Cet article en anglais, tel que publié en original dans l'ouvrage « *Vitamin-Binding Protein/Functional Consequences ; CRC Press 2013/2014 -ISBN : 9781439880166* », se trouve intégralement en annexe sous le titre : « *Chapter 2 : Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance* by Pangala V. Bhat and Daniel-Constantin Manolescu ». Sa version française est maintenant harmonieusement intégrée dans la revue de littérature de notre thèse, avec l'accord de Dr P.V. Bhat notre coauteur, soit le présent chapitre 2: « **La RBP4 dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2** », suite aux conseils de nos trois directeurs de recherches. Il est publié selon les normes éditoriales en cours pour les revues de littérature, avec des citations probantes plus un bref développement.

En vous remerciant de votre aimable attention,

Daniel Constantin Manolescu- BSc. (Ing), MSc, PhD.

Vitamin-Binding Proteins

Functional Consequences



Chapter 2 Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance 31
Pangala V. Bhat and Daniel-Constantin Manolescu

Edited by
Krishnamurti Dakshinamurti
Shyamala Dakshinamurti

 **CRC Press**
Taylor & Francis Group

Vitamin-Binding Protein – Functional Consequences

Group of authors – Edited by Krisnamurti Dakshinamurti, Shyamala Dakshinamurti

CRC Press
Taylor & Francis Group
6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300
Boca Raton FL 33487

711 Third Avenue
New York, NY 10017

2 Park Square, Milton Park
Abingdon, Oxon, OX14 4RN UK

© 2014 by Taylor & Francis Group, LLC
CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business

International Standard Book Number-13 : ISBN 978-1-4398-8016-6 (Hardback)

Contents

Preface.....	vii
Editors.....	ix
Contributors	xi

Chapter 1	Retinoic Acid: Metabolism, Developmental Functions, and Evolution	1
	<i>João E. Carvalho and Michael Schubert</i>	

Chapter 2	Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance	31
	<i>Pangala V. Bhat and Daniel-Constantin Manolescu</i>	

Chapter 3	Retinoic Acid and Immunity	49
	<i>Yoshishige Miyabe, Chie Miyabe, and Toshihiro Nanki</i>	

Chapter 4	Vitamin D ₃ Up-Regulated Protein 1 (VDUP1) and the Immune System.....	57
	<i>Hyun Woo Suh, Haiyoung Jung, Young Jun Park, and Inpyo Choi</i>	

2 Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance

Pangala V. Bhat and Daniel-Constantin Manolescu

CONTENTS

2.1	Introduction	31
2.2	Serum RBP4 and Retinoid Metabolism.....	32
2.2.1	Vitamin A and Adipogenesis.....	33
2.3	Obesity, Insulin Resistance, and T2DM	33
2.4	Association between RBP4, Obesity, and Insulin Resistance	34
2.4.1	Experimental Studies on RBP4 and Insulin Resistance	34
2.4.2	Clinical Studies on the Relationship between RBP4, Insulin Resistance, and T2DM	35
2.4.3	RBP4 in Gestational Diabetes Mellitus	36
2.4.4	RBP4, Obesity, and Insulin Resistance in Children and Adolescents	36
2.4.5	RBP4 in Diabetic Nephropathy	37
2.5	Clinical Studies Reporting a Lack of Correlation between RBP4, Obesity, and Insulin Resistance	38
2.6	Mechanisms Involved in RBP4 Effects on Insulin Resistance.....	39
2.7	Perspectives	40
	References.....	41

2.1 INTRODUCTION

Increased adipose mass, which is associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2DM) (Kahn and Flier 2000), is characterized by the impaired ability of insulin to reduce glucose output in the liver and to augment glucose uptake in adipose and muscle tissues (Saltiel and Khan 2001). The excess energy stored in adipose tissue plays a major role in the maintenance of whole-body energy homeostasis. It is well established that adipose tissues not only serve as inert energy storage depots but also secrete a number of signaling factors into the circulation, such as C-reactive protein, leptin, resistin, adiponectin, tumor necrosis factor- α (TNF α), and others (Rajala and Scherer 2003). These factors are believed to be involved in the development of insulin resistance. Another such signaling factor, retinol-binding protein-4 (RBP4), a protein whose only function was thought

to be the delivery of retinol (vitamin A) to tissues, was recently implicated as an adipokine in insulin resistance (Yang et al. 2005). This chapter summarizes the evidence gathered from studies in mice and humans on the linkage between RBP4, obesity, and insulin resistance.

2.2 SERUM RBP4 AND RETINOID METABOLISM

In 1968, Goodman and colleagues (Kanai et al. 1968) first reported the existence of a 21-kDa-transport protein for vitamin A in blood and called it RBP (retinol-binding protein). Later, in 2005, this protein was renamed RBP4 (Yang et al. 2005). Since 1968, extensive research has been performed to characterize it (Peterson 1971; Goodman 1974 and 1982; Blaner and Goodman 1990). A vast amount of literature exists on the molecular structure, distribution, synthesis, and regulation of RBP4 (Blaner 1989 and references therein). The liver is the major site where RBP4 is produced, and retinol is mobilized from liver vitamin A storage depots bound to newly synthesized RBP4 in a 1:1 molar ratio. In the circulation, RBP4 occurs as a protein complex with the high molecular weight protein transthyretin (TTR), which prevents its glomerular filtration and reduces its renal clearance (Peterson 1971). RBP4 ablation is not lethal to embryos. However, RBP4 deficiency in mice results in impaired vision (Vogel et al. 2002). Although hepatocytes are major sites of RBP4 synthesis and secretion, other organs and tissues, including adipose tissues, express RBP4 (Makeover et al. 1989; Tsutsumi et al. 1992). Adipocytes synthesize about 20% of the RBP4 amount in the liver and can release it from adipose tissues into the circulation (Tsutsumi et al. 1992). Recent studies have shown that RBP4 is not required for intrahepatic transport and storage of vitamin A (Quadro et al. 2002 and 2004). Little is known about the role of extra-hepatically synthesized RBP4. In normal physiological conditions, circulating retinol-RBP4 levels remain constant, changing only in response to extremes in the nutritional intake of vitamin A, protein, calories, zinc, and to hormonal factors, stress, or some disease states (Soprono and Blaner 1994).

Circulating holo-RBP4 delivers retinol to retinoid-responsive cells. Recent experiments have demonstrated the occurrence of cell surface receptors for retinol-RBP4 that facilitates the uptake of retinol from RBP4 into cells (Kawaguchi et al. 2007; Pasutto et al. 2007). Once inside target cells, retinol undergoes metabolism to metabolites, such as retinyl esters (storage), oxidation to the active compound retinoic acid (RA), and catabolism to 4-oxo and 5,6 epoxy derivatives (Frolik et al. 1979; Bhat and Lacroix 1983; Labrecque et al. 1995). Enzymes involved in the formation of these metabolites are well characterized (Napoli 2000; Bhat 2005), and their specific functions in vitamin A homeostasis have been established by gene knockout in mice (Gottesman et al. 2001). The active metabolite RA (*all-trans* and *9-cis*) binds to specific nuclear retinoic acid receptors (RAR α , β , and γ , and RXRs), which are ligand-dependent transcriptional factors that regulate gene expression (Chambon 1996). For efficient gene transcription, RXRs form homodimers and heterodimers with RARs, thyroid hormone receptor, vitamin D3 receptor, and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Zang et al. 1992; Mader et al. 1993; Rosen and Spiegelman 2001).

2.2.1 VITAMIN A AND ADIPOGENESIS

Adipose tissues are targets of RA action (Villarroya et al. 1999) and regulate differentiation via RA-nuclear receptors RARs and RXRs (Aleman et al. 2004). Vitamin A status influences the development and function of adipose tissues in whole animals, with vitamin A deficiency favoring increased fat deposition. Adipocytes are dynamically involved in retinoid storage and metabolism (Tsutsumi et al. 1992). Retinol dehydrogenase type 1, an enzyme that participates in RA production, is highly expressed in adipose tissues (Sima et al. 2011) and has recently been shown to play a major role in the regulation of fat depots in adipose tissues (Reichert et al. 2011). The transcriptional factor PPAR γ is abundantly expressed in adipocytes and forms a heterodimeric partner with RXR α , β , and γ , which also are expressed in adipose tissues (Metzer et al. 2005). Heterodimers PPAR γ /RXRs regulate the transcription of genes in insulin action, adipocyte differentiation, lipid metabolism, and inflammation (Lenhard 2001). Therefore, PPAR γ /RXRs are molecular targets in diabetes, and several drugs that activate these heterodimers have been developed to improve insulin action in T2DM (Mukherjee et al. 1997; Lebovitz and Banerji 2001).

2.3 OBESITY, INSULIN RESISTANCE, AND T2DM

Obesity is associated with a global increase in metabolic syndrome and T2DM. Among several essential features of these diseases, such as insulin resistance, impaired insulin secretion, hepatic steatosis, dyslipidemia, and atherosclerosis, insulin resistance is a common denominator (Kahn and Flier 2000). Under such conditions, hyperglycemia develops when increased insulin secretion no longer compensates for insulin resistance. In obesity-associated insulin resistance, multiple endocrine, inflammatory, and neural pathways are affected, which leads to disturbed signaling that is cell intrinsic (Qatanani and Lazar 2007). In obese subjects, plasma fatty acid elevation can facilitate insulin resistance by activating protein kinases (Petersen and Shulman 2006). Obesity-related changes in the secretion of adipokines, such as leptin, adiponectin, resistin, TNF α , and interleukin-6, impair insulin sensitivity (Kershaw and Flier 2004). Macrophage accumulation increases in the white adipose tissues of obese individuals, resulting in augmented adipose tissue production of inflammatory cytokines that affects insulin signaling (Weisberg et al. 2003). Furthermore, obesity-associated changes in brain responses to hormonal and metabolic signals alter peripheral insulin sensitivity (Pocai et al. 2005).

The liver, skeletal muscles, and adipose tissues are major targets of metabolic insulin action. Insulin regulates glucose homeostasis by decreasing hepatic glucose output and by augmenting the rate of glucose uptake by skeletal muscles and adipose tissues. Under normal physiological conditions, skeletal muscles are regarded as predominant sites of insulin-stimulated glucose uptake, and much less glucose is taken up by adipose tissues. Insulin-stimulated glucose uptake into muscle cells and adipocytes depends largely on translocation of the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 from intracellular compartments to the cell surface (Shepherd and Khan 1999). GLUT4 expression is diminished in adipocytes but not in skeletal muscles

of animals and humans with obesity and T2DM (DeFronzo 1997; Shepherd and Khan 1999). Since skeletal muscles are major sinks for glucose disposal, unaltered GLUT4 expression by the diabetogenic effect of reduced GLUT4 in adipocytes is unexpected. To explain this observation, Abel et al. (2001) hypothesized that a factor secreted into the circulation from adipose tissues induces insulin resistance in liver and muscle tissues.

2.4 ASSOCIATION BETWEEN RBP4, OBESITY, AND INSULIN RESISTANCE

Experiments on rodents and several clinical studies have revealed a strong positive relationship between serum RBP4, obesity, and insulin resistance.

2.4.1 EXPERIMENTAL STUDIES ON RBP4 AND INSULIN RESISTANCE

RBP4 involvement in insulin resistance was first discovered by Yang et al. (2005), by global gene expression analysis of epididymal adipose tissues harboring a primary genetic alteration in GLUT4 expression. These investigators observed that RBP4 expression levels were heightened by 2.3-fold in mice with adipocyte-specific GLUT4 ablation, whereas they were decreased by 54% in GLUT4-overexpressing mice, establishing an inverse relationship between GLUT4 and RBP4 expressions. Yang et al. (2005) also demonstrated that circulating RBP4 levels were increased not only in several mouse models of obesity and insulin resistance (genetically obese, *ob/ob*, and high-fat diet [HFD]-fed), but also in humans with these conditions. Furthermore, an insulin-sensitizing drug (rosiglitazone) lowered elevated RBP4 levels in both adipose tissue and serum of mice. When RBP4 levels were augmented in mice by either overexpressing or injecting RBP4, insulin resistance was induced, whereas knockout of the gene-encoding RBP4 enhanced insulin sensitivity compared to wild type mice.

Fenofibrate, a PPAR α activator, greatly diminished RBP4 mRNA levels in adipose tissues but not in the liver, which correlated with decreased circulating RBP4 and improvement of insulin sensitivity in obese rats (Wu et al. 2009). In spontaneously hypertensive rats, elevated plasma RBP4 and increased liver and epididymal RBP4 expression levels were associated with insulin resistance (Ou et al. 2011). Treatment of these rats with fenretinide to augment urinary RBP4 excretion significantly decreased plasma RBP4 levels with improvement of insulin sensitivity. In HFD-fed mice, RBP4 suppression in adipose tissues and liver by anti-RBP4 oligonucleotide resulted in decreased serum RBP4 with improved insulin sensitivity and prevention of metabolic syndrome (Tan et al. 2011). Elevated serum RBP4 levels were lowered in leptin-deficient, insulin-resistant *ob/ob* mice by RA, which resulted in increased insulin sensitivity (Manolescu et al. 2010). It is likely that, in addition to lowering serum RBP4, RA might exert its effects on glucose homeostasis by regulating RA-dependent genes involved in energy metabolism through RA-receptors.

These findings in experimental animals suggest that RBP4 is responsible for obesity-induced insulin resistance and represents a potential target in T2DM.

2.4.2 CLINICAL STUDIES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN RBP4, INSULIN RESISTANCE, AND T2DM

In obese nondiabetic and diabetic subjects, serum RBP4 levels are increased and positively correlated with body mass index (BMI) (Yang et al. 2005; Graham et al. 2006). Genetic modifications in RBP4 are linked with adiposity level and predisposition to visceral adipose mass accumulation (Kovacs et al. 2007; Munkhtulga et al. 2010). Several authors have reported an association of increased serum RBP4 and augmented visceral adipose content (Cho et al. 2006; Gavi et al. 2007; Jia et al. 2007; J. W. Lee et al. 2007; Kelly et al. 2010). In addition, higher RBP4 levels and markers of systemic inflammation are coupled with higher waist circumference and waist-to-hip ratio (Hermsdorff et al. 2010).

Decreased weight, achieved by exercise/diet or bariatric surgery, results in reduced serum/adipose RBP4 levels (Graham et al. 2006; Janke et al. 2006; Haider et al. 2007; Vitkova et al. 2007; Lee et al. 2008). Body weight diminution in nondiabetic subjects is accompanied by decreased serum RBP4 levels and improved insulin sensitivity (Lee et al. 2008). These authors also observed a significant correlation between serum RBP4 levels and abdominal visceral fat loss. In obese subjects, serum RBP4 is negatively associated with insulin secretion (Broch et al. 2007).

Linkage between RBP4 and lipid parameters has been noted in obese women after body weight loss due to bariatric surgery (Broch et al. 2010). Circulating RBP4 is positively correlated with liver fat rather than with total adipose fat in nondiabetic subjects (Stefan et al. 2007). Proteomic and metabolomic profiling of serum has revealed an association of RBP4 with obesity and body fat mass changes (Oberbach et al. 2011). In another study, decreased body weight achieved with exercise by obese women resulted in decreased serum RBP4 that predicted improvement in insulin sensitivity with greater specificity than other adipokines (Graham et al. 2006). In fasted, obese subjects, RBP4 was strongly correlated with retinol. These investigators also reported a low retinol-to-RBP ratio in obese subjects owing to elevated apo-RBP4 (Mills et al. 2008). Thus, a strong correlation exists between adiposity and increased serum and adipose tissue RBP4 levels.

Serum RBP4 levels correlated with the magnitude of insulin resistance in subjects with obesity, impaired glucose tolerance, or T2DM, and in nondiabetic subjects with a strong family history of T2DM (Yang et al. 2005; Cho et al. 2006; Graham et al. 2006; Chavez et al. 2009; Kloting et al. 2010). These investigators also observed linkage between serum RBP4 and metabolic syndrome components. Expression levels of serum adipokines in adipose tissues of T2DM patients revealed higher RBP4 expression in subcutaneous fat (Samaras et al. 2010), indicating that serum RBP4 elevation in insulin resistance conditions is the consequence of increased RBP4 synthesis and secretion from subcutaneous fat tissues.

Increased serum RBP4 levels are associated with insulin resistance in postmenopausal and elderly women (An et al. 2009; Suh et al. 2010). In addition, elevated serum RBP4 is coupled with metabolic syndrome components, such as increased BMI, waist-to-hip ratio, serum triglycerides, and systolic blood pressure. Interestingly, exercise training is accompanied by a reduction of serum RBP4 only in subjects in whom insulin resistance improved. Interventions that ameliorated insulin resistance

in humans lowered serum RBP4 (Haider et al. 2007; Lim et al. 2008; Ku et al. 2010). Treatment with the insulin sensitizer rosiglitazone reduced serum RBP4 in T2DM patients (Jia et al. 2007). Several RBP4 gene variants are linked with an increased risk of T2DM (Craig et al. 2007; Kovacs et al. 2007; Hu et al. 2008; van Hoek et al. 2008). These findings suggest that serum RBP4 levels are elevated in early stages of insulin resistance and could be a predictor of T2DM development, enabling early interventions. Since factors, such as exercise, weight loss, and insulin sensitizers, lower serum RBP4 levels, it could serve as a serum component in assessing improved insulin sensitivity.

Several studies have shown an association between circulating RBP4 levels and components of metabolic syndrome and other diseases, such as HIV infection, polycystic ovary syndrome, and psoriasis (Graham et al. 2006; von Eynatten et al. 2007; Han et al. 2009; Makino et al. 2009; Wu et al. 2009; Lim et al. 2010; Mohapatra et al. 2011; Mostafaie et al. 2011; Park et al. 2011; Gerdes et al. 2012; Mellati et al. 2012; Sopher et al. 2012). Some authors have postulated that elevated plasma RBP4 is a useful biomarker of atherosclerosis and cardiovascular disease development (Cabre et al. 2007; Ingelsson et al. 2009; Stuck and Kahn 2009; Sasaki et al. 2010; Pala et al. 2012). Higher epicardial RBP4 and lower GLUT-4 levels in epicardial and subcutaneous adipose tissues are associated with coronary artery disease (Salgado-Somoza et al. 2012). Increased plasma RBP4 is seen in patients with dilated inflammatory cardiomyopathy and a high incidence of T2DM (Bobbitt et al. 2009). Although all these studies disclosed a relationship between serum RBP4 and coronary heart disease, it is not clear whether the observed increase of RBP4 in these patients is the cause or consequence of coronary heart disease.

2.4.3 RBP4 IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS

One study found that serum RBP4 levels were not elevated in women with gestational diabetes mellitus (GDM). However, RBP4:retinol molar ratio was higher and correlated with fasting glucose in these patients, indicating that RBP4:retinol ratio is a better marker than RBP4 levels when assessing insulin resistance during pregnancy (Krzyzanowska et al. 2008). On the other hand, several authors have reported serum RBP4 elevation in pregnant women with GDM (Klein et al. 2010; Su et al. 2010; Ortega-Senovilla et al. 2011; Saucedo et al. 2011). These studies suggest that serum RBP4 levels could be considered as a valuable marker of insulin resistance and altered lipid metabolism in pregnancy. A positive correlation has been found between cord RBP4 concentrations and fetal birth weight, indicating that cord RBP4 is important in fetal growth (Chan et al. 2011). In another recent study, serum RBP4 levels and their expression in subcutaneous adipose tissues were shown to be elevated in women with GDM, indicating that the higher RBP4 expression in subcutaneous fat tissues may contribute to the increase in serum RBP4 in GDM (Kuzmicki et al. 2011).

2.4.4 RBP4, OBESITY, AND INSULIN RESISTANCE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

Linkage between RBP4, obesity, and metabolic syndrome has been investigated in children and adolescents from multiple ethnic backgrounds. Serum RBP4 levels

were elevated in both groups (Aeberli et al. 2007; Balagopal et al. 2007; Reinehr et al. 2008; Friebe et al. 2011; Yeste et al. 2010; Kim et al. 2011). In prepubertal and early pubertal children, serum RBP4 and RBP4-to-serum retinol ratio were correlated with obesity and metabolic syndrome components (Aeberli et al. 2007; J. W. Lee et al. 2007). In this study, other parameters, such as dietary vitamin A intake and subclinical inflammation, were also considered. An association between RBP4, insulin resistance, and triglycerides was found in nonobese adolescents and between RBP4 and triglycerides in obese adolescents.

Circulating RBP4 levels are elevated in obese children with glucose intolerance and are directly related to serum insulin, indicating that RBP4 may contribute to the development of muscle insulin resistance (Yeste et al. 2010). Another study found that serum RBP4 levels were correlated with adiposity and insulin resistance in obese children but not with insulin resistance occurring during puberty (Santoro et al. 2009). In a retrospective cohort, increased RBP4 was linked with higher odds of worsening insulin resistance in overweight black adolescents (Goodman et al. 2009). This study also suggested the utility of RBP4 as a biomarker of risk. In obese children, RBP4 has been primarily associated with adipose tissue mass and, secondarily, with metabolic and cardiovascular parameters (Friebe et al. 2011). In early to mid-adolescence, serum RBP4 concentrations are coupled with multiple risk factors for adiposity-related comorbidities (Conroy et al. 2011). Another study discerned that circulating RBP4 levels were independently associated with adiposity and pubertal development but not with insulin resistance (Rhie et al. 2011). In a prospective cohort study, overweight children had significantly higher RBP4 concentrations than normal weight children (Choi et al. 2011).

Lifestyle interventions decreased serum RBP4 levels that correlated with the magnitude of decrease in inflammatory markers (Balagopal et al. 2007). In a longitudinal follow-up study of obese children, weight loss resulted in decreased RBP4 levels, RBP4-to-serum retinol ratio, and improved insulin sensitivity, suggesting linkage between RBP4, obesity, and insulin resistance in children (Reinehr et al. 2008).

2.4.5 RBP4 IN DIABETIC NEPHROPATHY

Nephropathy, a serious microvascular complication in T2DM, is characterized initially by the appearance of low but abnormal levels of albumin in urine—referred to as microalbuminuria (Tomaszewski et al. 2007). Earlier studies showed elevated RBP4 levels in impaired kidney function, attributed to reduced glomerular filtration and catabolism of RBP4 in the kidneys (Scarpioni et al. 1976; Bernard et al. 1988). Furthermore, impaired RBP4 catabolism resulted in accumulation of a truncated variant of RBP4 in plasma of patients with chronic renal failure (Jaconi et al. 1996). In T2DM patients with microalbuminuria, plasma RBP4 levels were found to be higher despite no differences in plasma retinol levels (Raila et al. 2007). These investigators also established no correlation of plasma RBP4 levels and insulin resistance parameters. Renal dysfunction, as measured by serum uric acid levels, albuminuria severity, and glomerular filtration rate in diabetic patients, was associated with elevated RBP4 (Chang et al. 2008; Henze et al. 2008). Heightened plasma RBP4 levels were observed in diabetic patients with renal disease and correlated with creatinine levels as well

as 24-hour creatinine clearance (Masaki et al. 2008). An association of RBP4 with impaired glucose regulation and microalbuminuria has been reported in a Chinese population (Xu et al. 2009). In another study, neither retinopathy nor cardiovascular complications affected serum RBP4 levels, but renal function determined RBP4 levels in T2DM (Akbay et al. 2010). In an observational investigation, kidney donors were found to be more susceptible to insulin resistance (Shehab-Elden et al. 2009). It has been reported that unilateral nephrectomy results in increased serum retinol and RBP4 levels (Henze et al. 2011). However, it is not clear whether elevation of serum RBP4 observed after nephrectomy contributes to insulin resistance in kidney donors. In a cross-sectional study, glomerular filtration rate was seen to be the major determinant of serum RBP4 levels rather than the presence of T2DM. All these studies indicate that kidney function but not T2DM contributes to serum RBP4 elevation.

2.5 CLINICAL STUDIES REPORTING A LACK OF CORRELATION BETWEEN RBP4, OBESITY, AND INSULIN RESISTANCE

Not all investigations in humans have shown that circulating RBP4 levels are elevated in obesity or T2DM, and an inverse correlation has been observed between serum RBP4 concentration and insulin resistance. Janke et al. (2006) detected no difference in serum RBP4 levels between lean, overweight, and obese menopausal nondiabetic women. In addition, these investigators found no correlation between RBP4 adipose gene expression and plasma RBP4 concentrations. In male subjects with T2DM or coronary artery disease, serum RBP4 levels did not correlate with insulin resistance (von Eynatten et al. 2007). In another study, plasma RBP4 levels were not altered in healthy, insulin-resistant humans and were not correlated with insulin sensitivity (Promintzer et al. 2007). Unlike plasma RBP4 elevation in T2DM patients, lower plasma RBP4 was reported in one study (Erikstrup et al. 2008). These investigators observed higher RBP4-to-retinol ratios in individuals with T2DM, suggesting that higher levels of RBP4 relative to retinol, expressed as RBP4-to-retinol ratio, are more indicative of T2DM than RBP4 itself.

Calorie restriction in obese, nondiabetic, premenopausal women resulted in reduced adipose RBP4 expression and plasma RBP4 levels. However, no correlation was found between diet-induced changes of RBP4 and insulin sensitivity (Vitkova et al. 2007). In humans with a wide range of BMI and insulin resistance, no significant relationship was observed between either adipose RBP4 expression or plasma RBP4 concentration and insulin resistance (Yao-Borengasser et al. 2007). Serum RBP4 levels are reduced in patients with liver cirrhosis, and are not related to insulin resistance in these patients (Yagmur et al. 2007). In another study, no correlation was apparent between serum RBP4 levels and insulin resistance in women at high or low risk for vascular disease (Silha et al. 2007). Broch et al. (2007) reported no difference in serum RBP4 concentration among lean, overweight, and obese subjects and no association with age, BMI, weight-to-hip ratio, and insulin sensitivity. However, they found a negative association of circulating RBP4 with insulin secretion in obese subjects.

A study of Mexican Americans showed no linkage of RBP4 with obesity, insulin resistance, and impaired insulin secretion. However, elevation of plasma RBP4 and its association with impaired glucose tolerance was observed in this study (Chavez

et al. 2009). Data on the study population, comprised of elderly twins, indicated that elevated plasma RBP4 in T2DM is a secondary and predominantly nongenetic phenomenon and may play a minor role in the development of insulin resistance (Ribel-Madsen et al. 2009). In children and adolescents, serum RBP4 levels did not differ between prepubertal and pubertal stages, despite the latter being significantly more insulin resistant, suggesting a lack of causal association between RBP4 and insulin resistance in this study population (Santoro et al. 2009). A recent study disclosed higher serum RBP4 levels in obese men (mean BMI 41.6 kg/m²) than in obese women. However, no association of RBP4 levels with insulin resistance or metabolic syndrome components was observed (Ulgen et al. 2010). The lack of RBP4 correlation with insulin resistance in this study could have been due to the severity of obesity in patients.

Several alternative explanations have been proposed for the observed lack of positive correlations between serum RBP4 levels, obesity, and insulin resistance in the aforementioned studies. In most investigations in humans, renal function was not taken into consideration. Since T2DM is often associated with renal dysfunction, which leads to serum RBP4 elevation, it is possible that the increased serum RBP4 observed in some studies could have been attributed to impaired renal function rather than insulin resistance per se (Chang et al. 2008; Henze et al. 2008; Masaki et al. 2008). Differences in the study population, including age, gender, ethnicity, sample size, insulin resistance status, degree of obesity (as measured by BMI), and metabolic syndrome parameters, might also have contributed to the divergent results. Age and sex were found to be independent determinants of plasma RBP4 (Cho et al. 2006; Gavi et al. 2007). In several studies, vitamin A status of patients, which may influence serum RBP4 concentrations, was not addressed (Promintzer et al. 2007). Retinol is mainly transported by RBP4, which serves as a precursor for the synthesis of ligands (RAs) for nuclear hormone receptors. Thus, its levels in serum may affect insulin resistance. It is also possible that T2DM in patients receiving glucose-lowering medications or insulin might affect serum RBP4 levels (von Eynatten et al. 2007; Chavez et al. 2009; Ribel-Madsen et al. 2009).

Shortcomings in the methodology of quantifying serum RBP4 levels as well as handling and storage of serum samples have been cited. Most studies adopted competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure serum RBP4. Anticoagulants added during the collection of blood samples may alter absolute RBP4 immunoreactivity values. In addition, high lipid levels present in plasma samples of obese and T2DM patients may interfere with ELISA. Furthermore, experimental design and different types of antibodies employed in immunoassays may impact serum RBP4 levels. Graham et al. (2007) proposed quantitative Western blotting standardized to full-length RBP4 as a reliable method for quantifying serum RBP4. It provides higher and consistent amounts of RBP4 in serum.

2.6 MECHANISMS INVOLVED IN RBP4 EFFECTS ON INSULIN RESISTANCE

The mechanisms by which RBP4 induces insulin resistance are not well understood. Although a correlation exists between adipose RBP4 expression and elevated serum

RBP4 levels in insulin resistance mouse models (Yang et al. 2005; Wu et al. 2009) and in some human subjects with obesity and T2DM (Graham et al. 2006; Kelly et al. 2010; Samaras et al. 2010), the absolute contribution of adipose tissues to increased serum RBP4 values is not known. Since the majority of circulating RBP4 is derived from the liver, it is likely that this organ may also contribute to the serum RBP4 elevation in insulin resistance conditions. It is not clear whether RBP4 synthesized in adipose tissues carries retinol or other ligands, which may be responsible for the development of insulin resistance. However, recent studies have shown that RBP4, synthesized exclusively in the muscles, bound retinol and TTR in the circulation, indicating that extrahepatic RBP4 can transport retinol (Quadro et al. 2002, 2004).

The other possibility is that elevated holoRBP4 (retinol bound to RBP4) rather than apoRBP4 may be involved in the development of insulin resistance. This view is supported by the recent finding that a non-retinoid compound (A1120) binds to RBP4 and lowers serum RBP4 but is unable to enhance insulin sensitivity (Motani et al. 2009), whereas the retinoid fenretinide and RAs not only reduce serum RBP4 but also improve insulin sensitivity (Yang et al. 2005; Manolescu et al. 2010; Preitner et al. 2009). Consistent with a retinoid-dependent mechanism, RBP4 heightened the hepatic expression of a retinoid-regulated gene, the gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (Yang et al. 2005). In addition, retinol was shown to be involved in islet development and secretion of insulin from islets (Chertow et al. 1987; Mathews et al. 2004).

In primary human adipocytes, RBP4 inhibited phosphorylation at the site of insulin receptor substrate-1 that may be involved in integrating nutrient sensing with insulin signaling (Ost et al. 2007). Cyclic AMP-induced RBP4 gene and protein expression is modulated by the high mobility group A1 (HMGA1) gene, indicating a novel biochemical pathway comprising the cAMP-HMGA1-RBP4 system in glucose homeostasis (Chieffari et al. 2009). TTR elevation has been found in insulin-resistant *ob/ob* mice, suggesting that increased TTR or alterations in RBP4-TTR binding may contribute to insulin resistance (Mody et al. 2008). Another study implicated iron-associated insulin resistance as being responsible for the impaired insulin action caused by RBP4 (Fernandez-Real et al. 2008). A recent investigation identified RBP-retinol as an activator of a STRA6/JAK2/STAT5 cascade that induces expression of the inhibitor of insulin signaling, SOCS3, providing a molecular basis for insulin resistance caused by elevated serum RBP4 (Berry et al. 2011).

2.7 PERSPECTIVES

Experiments in rodents have clearly demonstrated an association between RBP4 and insulin resistance. In clinical studies, however, the role of RBP4 in the development of insulin resistance remains controversial. It appears that many confounding factors that affect the proposed association should be considered when interpreting the results in humans. The choice of subjects, including ethnic background, age, sex, severity of obesity, and insulin resistance, might contribute to differences in outcomes. Other factors, such as metabolic syndrome parameters and cardiovascular disease, should be carefully evaluated in establishing the relationship between RBP4, obesity, and insulin resistance. Collection, handling of serum samples, and

serum RBP4 analysis must be considered carefully and should be standardized with results from insulin-resistant mouse models before application to human samples.

Retinol status, iron values, and kidney function, which all affect serum RBP4, must be taken into account in future studies. More experimental work is needed to understand the synthesis, regulation, and secretion of RBP4 in adipocytes. The role of adipocytes and the liver in the regulation of serum RBP4 levels has to be defined. Limited information is available on the overall metabolism of retinol in obese and insulin resistance conditions. Future studies on retinol storage, transport, and metabolism in obese and insulin-resistant mouse models may provide new insights into the involvement of RBP4-retinol in the development of insulin resistance.

REFERENCES

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K. et al. 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729–733.
- Aeberli, I., Biebinger, R., Lehmann, R. et al. 2007. Serum retinol-binding 4 concentrations and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4359–4365.
- Akbay, E., Muslu, N., Nayir, E. et al. 2010. Serum retinol binding protein 4 levels is related with renal functions in type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 33:725–729.
- Aleman, G., Torres, N., and Tovar, A. R. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity, and insulin resistance development. *Rev Invest Clin* 56:351–367.
- An, C., Wang, H., Liu, X. et al. 2009. Serum retinol binding protein 4 is elevated and positively associated with insulin resistance in postmenopausal women. *Endocr J* 56:987–996.
- Balogopal, P., Graham, T. E., Kahn, B. B. et al. 2007. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: Association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1971–1974.
- Bernard, A., Vyskocyl, A., Mahieu, P. et al. 1988. Effect of renal insufficiency on concentration of free retinol-binding protein in urine and serum. *Clin Chim Acta* 171:85–93.
- Berry, D. C., Jin, H., Majumdar, A. et al. 2011. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:4340–4345.
- Bhat, P. V. 2005. Role of retinol dehydrogenase type 1 (RALDH1) in retinoic acid biosynthesis. *Enzymol Mol Biol* 12:66–72.
- Bhat, P. V. and Lacroix, A. 1983. Separation and estimation of retinyl fatty acyl esters in tissues of normal rat by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 272:269–278.
- Blaner, W. S. 1989. Retinol binding protein: The serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 10:308–316.
- Blaner, W. S. and Goodman, D. S. 1990. Purification and properties of plasma retinol-binding protein. *Methods Enzymol* 189:193–206.
- Bobbert, P., Weithauser, A., Andres, J. et al. 2009. Increased plasma retinol binding protein 4 levels in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 11:1163–1168.
- Broch, M., Gomez, J. M., Auguet, M. T. et al. 2010. Association of retinol-binding protein-4 (RBP4) with lipid parameters in obese women. *Obes Surg* 20:1258–1264.
- Broch, M., Vendrell, J., Ricart, W. et al. 2007. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care* 30:1802–1806.
- Cabre, A., Lazaro, I., Girona, J. et al. 2007. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med* 262:496–503.

Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940–954.

Chan, T. F., Tsai, Y. C., Wu, C. H. et al. 2011. The positive correlation between cord serum retinol-binding protein 4 concentrations and fetal growth. *Gynecol Obstet Invest* 72:98–102.

Chang, Y. H., Lin, K. D., Wang, C. L. et al. 2008. Elevated serum retinol-binding protein 4 concentrations are associated with renal dysfunction and uric acid in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 24:629–634.

Chavez, A. O., Coletta, D. K., Kamath, S. et al. 2009. Retinol-binding protein 4 is associated with impaired glucose tolerance but not with whole body or hepatic insulin resistance in Mexican Americans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E758–E764.

Chertow, B. S., Blaner, W. S., Baranetsky, N. G. et al. 1987. Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets. *J Clin Invest* 79:163–169.

Chieffari, E., Paonessa, F., Liritano, S. et al. 2009. The cAMP-HMGA1-RBP4 system: A novel biochemical pathway for modulating glucose homeostasis. *BMC Biol* 21:7–24.

Cho, Y. M., Youn, B. S., Lee, H. et al. 2006. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:2457–2461.

Choi, K. M., Yannakoulia, M., Park, M. S. et al. 2011. Serum adipocyte fatty acid-binding protein, retinol binding protein 4, and adiponectin concentrations in relation to the development of the metabolic syndrome in Korean boys: A 3-y prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 93:19–26.

Conroy, R., Espinal, Y., Fennoy, I. et al. 2011. Retinol binding protein 4 is associated with adiposity-related co-morbidity risk factors in children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 24:913–919.

Craig, R. L., Chu, W. S., and Elbein, S. C. 2007. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol Genet Metab* 90:338–344.

DeFronzo, R. A. 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: Metabolic and molecular implications for identifying diabetes gene. *Diabetes Rev* 5:171–269.

Erikstrup, C., Mortensen, O. H., and Nielsen, A. R. 2008. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 11:204–212.

Fernandez-Real, J. M., Moreno, J. M., and Ricart, W. 2008. Circulating retinol-binding protein-4 concentration might reflect insulin resistance-associated iron overload. *Diabetes* 57:1918–1925.

Friebe, D., Neef, M., Erbs, S. et al. 2011. Retinol binding protein 4 (RBP4) is primarily associated with adipose tissue mass in children. *Int J Pediatr Obes* 6:e346–e352.

Frolik, C. A., Roberts, A. B., Tavela, T. E. et al. 1979. Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxoretinoic acid: In vitro metabolites of all-trans retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry* 18:2092–2097.

Gavi, S., Stuart, L. M., Kelly, P. et al. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1886–1890.

Gerdas, S., Osadtschy, S., Rostami-Yazdi, M. et al. 2012. Leptin, adiponectin, visfatin and retinol-binding protein-4 mediators of comorbidities in patients with psoriasis. *Exp Dermatol* 21:43–47.

Goodman, D. S. 1974. Vitamin A transport and RBP metabolism. *Vitam Horm* 32:167–180.

Goodman, D. S. 1982. Retinoid-binding proteins. *J Am Acad Dermatol* 6:583–590.

Goodman, E., Graham, T. E., Dolan, L. M. et al. 2009. The relationship of retinol binding protein 4 to changes in insulin resistance and cardiometabolic risk in overweight black adolescents. *J Pediatr* 154:67–73.

Gottesman, M. E., Quadro, L., and Blaner, W. S. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *BioEssays* 23:409–419.

Graham, T. E., Wason, C. J., Blucher, M. et al. 2007. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* 50:814–823.

Graham, T. E., Yang, Q., Blucher, M. et al. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552–2563.

Haider, D. G., Schindler, K., Prager, G. et al. 2007. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1168–1171.

Han, S. H., Chin, B. S., Lee, H. S. et al. 2009. Serum retinol-binding protein 4 correlates with obesity, insulin resistance, and dyslipidemia in HIV-infected subjects receiving highly active antiretroviral therapy. *Metabolism* 58:1523–1529.

Henze, A., Frey, S. K., Reila, J. et al. 2008. Evidence that kidney function but not type 2 diabetes determines retinol-binding protein 4 serum levels. *Diabetes* 57:3323–3326.

Henze, A., Reila, J., Kempf, C. et al. 2011. Vitamin A metabolism is changed in donors after living kidney transplantation: An observational study. *Lipids Health Dis* 10:231.

Hermisdorff, H. H., Zulet, M. A., Puchau, B. et al. 2010. Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults. *Inflammation* 34:161–170.

Hu, C., Jia, W., Zang, R. et al. 2008. Effect of RBP4 gene variants on circulating RBP4 concentration and type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabetes Med* 25:11–18.

Ingelsson, E., Sundstrom, J., Melhus, H. et al. 2009. Circulating retinol-binding protein 4, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease in elderly. *Atherosclerosis* 206:239–244.

Jaconi, S., Saurat, J. H., and Siegenthaler, G. 1996. Analysis of normal and truncated holo- and apo-retinol binding protein (RBP) in human serum: Altered ratios in chronic renal failure. *Eur J Endocrinol* 134:576–582.

Janke, J., Engeli, S., Boschmann, M. et al. 2006. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 55:2805–2810.

Jia, W., Wu, H., Bao, Y. et al. 2007. Association of serum retinol-binding protein 4 and visceral adiposity in Chinese subjects with and without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3224–3229.

Kahn, B. B. and Flier, J. S. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473–481.

Kanai, M., Raz, A., and Goodman, D. S. 1968. Retinol binding protein: The transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47:2025–2044.

Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J. et al. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315:820–825.

Kelly, K. R., Kashyap, S. R., O'Leary, V. B. et al. 2010. Retinol-binding protein 4 (RBP4) protein expression is increased in omental adipose tissue of severely obese patients. *Obesity* 18:663–666.

Kershaw, E. E. and Flier, J. S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548–2556.

Kim, I. K., Lee, H. J., Kang, J. H. et al. 2011. Relationship of serum retinol-binding protein 4 with weight status and lipid profile among Korean children and adults. *Eur J Clin Nutr* 65:226–233.

Klein, K., Bancher-Todesca, D., Leipold, H. et al. 2010. Retinol-binding protein 4 in patients with gestational diabetes mellitus. *J Womens Health* 19:517–521.

Kloting, N., Fasshauer, M., Deitrich, A. et al. 2010. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E506–E515.

Kovacs, P., Geyer, M., Berndt, J. et al. 2007. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein 4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes* 56:3095–3100.

- Krzyzanowska, K., Zeman, L., Krugluger, W. et al. 2008. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia* 51:1115–1122.
- Ku, Y. H., Han, K. A., Ahn, H. et al. 2010. Resistance exercise did not alter intramuscular adipose tissue but reduced retinol-binding protein-4 concentration in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res* 38:782–791.
- Kuzmicki, M., Telejko, B., Wawrusiewicz-Kurylonek, N. et al. 2011. Retinol-binding protein 4 in adipose and placental tissue of women with gestational diabetes. *Gynecol Endocrinol* 27:1065–1069.
- Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A. et al. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and *all-trans* retinoic acid. *Biochem J* 305:681–684.
- Leibovitz, H. E. and Banerji, M. A. 2001. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Rec Prog Horm Res* 56:265–410.
- Lee, D. C., Lee, J. W., and Im J. A. 2007. Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents. *Metabolism* 56:327–331.
- Lee, J. W., Im, J. A., Lee, H. R. et al. 2007. Visceral adiposity is associated with serum retinol binding protein-4 levels in healthy women. *Obesity* 15:2225–2232.
- Lee, J. W., Lee, H. R., Shim, J. Y. et al. 2008. Abdominal visceral fat reduction is associated with favourable changes of serum retinol-binding protein 4 in nondiabetic subjects. *Endocrine J* 55:811–818.
- Lenhard, J. M. 2001. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels* 7:248–258.
- Lim, S., Choi, S. H., Jeong, I. K. et al. 2008. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol binding-4 concentrations in young and middle aged women. *J Endocrinol Metab* 93:2263–2268.
- Lim, S., Yoon, J. W., Choi, S. H. et al. 2010. Combined impact of adiponectin and retinol-binding protein 4 on metabolic syndrome in elderly people: The Korean longitudinal study on health and aging. *Obesity* 18:826–832.
- Mader, S., Chen, J. Y., Chen, Z. et al. 1993. The patterns of binding affinities of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 15:5029–5041.
- Makeover, A., Soprano, D. R., Wyatt, M. L. et al. 1989. Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and in perinephric fat tissue. *J Lipid Res* 30:171–180.
- Makino, S., Fujiwara, M., Suzukawa, K. et al. 2009. Visceral obesity is associated with the metabolic syndrome and elevated plasma retinol-binding protein-4 level in obstructive sleep apnea syndrome. *Horm Metab Res* 41:221–226.
- Manolescu, D. C., Sima, A., and Bhat, P. V. 2010. All-*trans* retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr* 140:311–316.
- Masaki, T., Anan, F., Tsubone, T. et al. 2008. Retinol binding protein 4 concentrations are influenced by renal function in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 57:1340–1344.
- Mathews, K. A., Rhoten, W. B., Driscoll, H. K. et al. 2004. Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats. *J Nutr* 134:1958–1963.
- Mellati, A. A., Sharifi, F., Sajadinejad, M. et al. 2012. The relationship between retinol-binding protein 4 levels, insulin resistance, androgen hormones and polycystic ovary syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 72:39–44.
- Metzger, D., Imai, T., Jiang, M. et al. 2005. Functional role of RXRs and PPAR gamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:51–58.
- Mills, J. P., Furr, H. C., and Tanumihardjo, S. A. 2008. Retinol to retinol-binding protein (RBP) is low in obese adults due to elevated apo-RBP. *Exp Biol Med* 233:1255–1261.
- Mody, N., Graham, T. E., Tsuji, Y. et al. 2008. Decreased clearance of serum retinol-binding protein and elevated levels of transthyretin in insulin-resistant *ob/ob* mice. *Am J Physiol Metab* 294:E785–E793.
- Mohapatra, J., Sharma, M., Acharya, A. et al. 2011. Retinol-binding protein 4: A possible role in cardiovascular complications. *Br J Pharmacol* 164:1939–1948.
- Mostafaie, N., Sebesta, C., Zehetmayer, S. et al. 2011. Circulating retinol-binding protein 4 and metabolic syndrome in the elderly. *Wien Med Wochenschr* 161:505–510.
- Motani, A., Zhulun, W., Conn, M. et al. 2009. Identification and characterization of a non-retinoid ligand for retinol-binding 4 levels *in vivo*. *J Biol Chem* 284:7673–7680.
- Mukherjee, R., Davies, P. J., Crombie, D. L. et al. 1997. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonist. *Nature* 386:407–410.
- Munkhtulga, L., Nagashima, S., Nakayama, K. et al. 2010. Regulatory SNP in the RBP4 gene modified the expression in adipocytes and associated with BMI. *Obesity* 18:1006–1014.
- Napoli, J. L. 2000. Retinoic acid: Its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res* 63:139–188.
- Oberbach, A., Blüher, M., Wirth, H. et al. 2011. Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *J Proteome Res* 10:4769–4788.
- Ortega-Senovilla, H., Schaefer-Graf, U., Meitzner, K. et al. 2011. Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipokines in cord blood. *Diabetes Care* 34:2061–2066.
- Ost, A., Danielsson, A., Liden, M. et al. 2007. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *FASEB J* 21:3696–3704.
- Ou, H. Y., Wu, H. T., Yang, Y. C. et al. 2011. Elevated retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Horm Metab Res* 43:312–318.
- Pala, A., Monami, M., Ciani, S. et al. 2012. Adipokines as possible new predictors of cardiovascular diseases: A case control study. *J Nutr Metab* 2012:253428.
- Park, C. S., Ihm, S. H., Park, H. J. et al. 2011. Relationship between plasma adiponectin, retinol binding protein 4 and uric acid in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Korean Circ J* 41:198–202.
- Pasutto, F., Sticht, H., Hammersen, G. et al. 2007. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 80:550–560.
- Petersen, K. F. and Shulman, G. I. 2006. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119:S10–S16.
- Peterson, P. A. 1971. Characterization of a vitamin A transport protein complex occurring in human serum. *J Biol Chem* 246:34–43.
- Pocai, A., Obici, S., Schwartz, G. J. et al. 2005. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 1:53–61.
- Preitner, F., Mody, N., Graham, T. E. et al. 2009. Long-term Fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1420–E1429.
- Promintzer, M., Krebs, M., Todoric, J. et al. 2007. Insulin resistance is unrelated to circulating retinol binding protein and protein C inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4306–4312.
- Qatanani, M. and Lazar, M. A. 2007. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes Dev* 21:1443–1455.
- Quadro, L., Blaner, W. S., Hamberger, L. et al. 2002. Muscle expression of human retinol-binding protein (RBP). Suppression of the visual defect of RBP knockout mice. *J Biol Chem* 277:30191–30197.
- Quadro, L., Blaner, W. S., Hamberger, L. et al. 2004. The role of extrahepatic retinol binding protein in the mobilization of retinoid stores. *J Lipid Res* 45:1975–1982.

- Raila, J., Henze, A., Spranger, J. et al. 2007. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 72:505–511.
- Rajala, M. W. and Scherer, P. E. 2003. The adipocyte... at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765–3773.
- Reichert, B., Yasmien, R., Jeyakumar, S. M. et al. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol Endocrinol* 25:799–809.
- Reincher, T., Stoffel-Wagner, B., and Roth, C. L. 2008. Retinol-binding protein 4 and its relation to insulin resistance in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2287–2293.
- Rhie, Y. J., Choi, B. M., Eun, S. H. et al. 2011. Association of serum retinol binding protein 4 with adiposity and pubertal development in Korean children and adolescents. *J Korean Med Sci* 26:797–802.
- Ribel-Madsen, R., Friedrichsen, M., Vaag, A. et al. 2009. Retinol-binding protein 4 in twins. Regulatory mechanisms and impact of circulating and tissue expression levels on insulin secretion and action. *Diabetes* 58:54–60.
- Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. 2001. PPAR gamma: A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276:37731–37734.
- Salgado-Somoza, A., Teixeira-Fernandez, E., Rubio, J. et al. 2012. Coronary artery disease is associated with higher epicardial retinol-binding protein 4 (RBP4) and lower glucose transporter (GLUT) 4 levels in epicardial and subcutaneous adipose tissue. *Clin Endocrinol* 76:51–58.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.
- Samaras, K., Botelho, N. K., and Chisholm, D. J. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Diabetes* 59:884–889.
- Santoro, N., Perrone, L., Cirillo, G. et al. 2009. Variations of retinol binding protein 4 levels are not associated with changes in insulin resistance during puberty. *J Endocrinol Invest* 32:411–414.
- Sasaki, M., Otani, T., Kawakami, M. et al. 2010. Elevation of plasma retinol-binding protein 4 and reduction of plasma adiponectin in subjects with cerebral infarction. *Metabolism* 59:527–532.
- Saucedo, R., Zarate, A., Basurto, L. et al. 2011. Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. *Arch Med Res* 42:318–323.
- Scarpioni, L., Dall'aglio, P. P., Poietti, P. G. et al. 1976. Retinol binding protein in serum and urine of glomerular and tubular nephropathies. *Clin Chim Acta* 68:107–113.
- Shehab-Elden, W., Shob, S., Khamis, S. et al. 2009. Susceptibility to insulin resistance after kidney donation: A pilot observational study. *Am J Nephrol* 30:371–376.
- Shepherd, P. R. and Khan, B. B. 1999. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetic mellitus. *N Engl J Med* 341:248–257.
- Silha, J. V., Gregoire-Nyomba, B. L., Leslie, W. D. 2007. Ethnicity, insulin resistance, and inflammatory adipokines in women at high and low risk for vascular disease. *Diabetes Care* 30:286–291.
- Sima, A., Manolescu, D.-C., and Bhat, P. V. 2011. Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues. *Biochem Cell Biol* 89:578–584.
- Sopher, A. B., Gerken, A. T., Blazer W. S. et al. 2012. Metabolic manifestations of polycystic ovary syndrome in nonobese adolescents: Retinol-binding protein 4 and ectopic fat deposition. *Fertil Steril* 97:1009–1015.
- Soprono, D. R. and Blazer, W. S. 1994. Plasma retinol-binding protein. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, eds. Raven Press, New York: 257–282.
- Stefan, N., Hennige, A. M., and Staiger, H. 2007. High circulating retinol-binding protein 4 is associated with elevated liver fat but not with total, subcutaneous, visceral, or intramyocellular fat in humans. *Diabetes Care* 30:1173–1178.
- Stuck, B. J. and Kahn, B. B. 2009. Retinol binding protein 4 (RBP4): A biomarker for subclinical atherosclerosis. *Am J Hypertens* 22:948–949.
- Su, Y. X., Hong, J., Yan, Q. et al. 2010. Increased serum retinol-binding protein-4 levels in pregnant women with and without gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 36:470–475.
- Suh, J. B., Kim, S. M., Cho, G. J. et al. 2010. Elevated serum retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance in older women. *Metabolism* 59:118–122.
- Tan, Y., Sun, L. Q., Kamal, M. A. et al. 2011. Suppression of retinol-binding protein 4 with RNA oligonucleotide prevents high-fat diet-induced metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Biochim Biophys Acta* 1811:1045–1053.
- Tomaszewski, M., Charchar, F. J., Maric, C. et al. 2007. Glomerular hyperfiltration: A new marker of metabolic risk. *Kidney Int* 71:816–821.
- Tsutsumi, C., Okuno, M., Tannous, L. et al. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 267:1805–1810.
- Ulgien, F., Herder, C., Kuhn, M. C. et al. 2010. Association of serum levels of retinol-binding protein 4 with male sex but not with insulin resistance in obese patients. *Arch Physiol Biochem* 116:57–62.
- van Hoek, M., Dehghan, A., Zillikens, M. C. et al. 2008. An RBP4 promoter polymorphism increases risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 51:1423–1428.
- Villarroja, F., Giral, M., and Iglesias, R. 1999. Retinoids and adipose tissue: Metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1–6.
- Vitkova, M., Klimcakova, E., Kovacikova, M. et al. 2007. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2330–2335.
- Vogel, S., Piantadosi, R., O'Bryne, S. M. et al. 2002. Retinol-binding protein-deficient mice: Biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry* 41:15360–15368.
- von Eynatten, M., Lepper, P. M., Liu, D. et al. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with components of metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary heart disease. *Diabetologia* 50:1930–1937.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M. et al. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1789–1808.
- Wu, H., Wei, L., Bao, Y. et al. 2009. Fenofibrate reduces serum retinol-binding protein-4 by suppressing its expression in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E628–E634.
- Xu, M., Li, X. Y., Wang, J. G. et al. 2009. Retinol binding protein 4 is associated with impaired glucose regulation and microalbuminuria in a Chinese population. *Diabetologia* 52:1511–1519.
- Yagmur, E., Weiskirchen, R., Gressner, A. M. et al. 2007. Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care* 30:1168–1172.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N. et al. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356–362.
- Yao-Borengasser, A., Varma, V., Bodles, A. M. et al. 2007. Retinol binding protein 4 expression in humans: Relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2590–2597.
- Yeste, D., Vendrell, J., Tomasini, R. et al. 2010. Retinol-binding protein 4 levels in obese children and adolescents with glucose intolerance. *Horm Res Pediatr* 73:335–340.
- Zang, X. K., Lehman, J., Hoffmann, B. et al. 1992. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 358:587–591.

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Annexes 3. Notes biographiques, excellence, rayonnement et recommandations

Note : Ce chapitre présente brièvement notre parcours socioprofessionnel. Il vous permettra de comprendre pourquoi, par passion et dévouement pour la recherche, nous avons travaillé deux ans de plus dans notre présent PhD, pour publier des données pour un troisième article, alors que la Faculté de Médecine ne demande que deux articles pour un doctorat PhD.

Nous avons également maintenu nos moyennes académiques au Doctorat et à la Maîtrise dans les fourchettes de l'excellence, avec des qualificatifs et notes parmi les A; A+; 4,3 et 4,5.

En vous remerciant de votre aimable attention,

Daniel Constantin Manolescu- BSc. (ing), MSc, PhD



Université de Montréal

Daniel-Constantin Manolescu

RELEVÉ DE NOTES

DATE D'ÉMISSION 23 AOÛT 2011

CODE PERMANENT

CATÉGORIE D'ÉTUDIANT REGULIER

GRADE POSTULÉ PH.D. NUTRITION

TITRE DU COURS	NUMÉRO	NAT.	CRÉDITS	NOTE	C.M.	MOYENNE DU GROUPE	DURÉE		M.E.
							DÉBUT	FIN	
PROGRAMME: PH.D. NUTRITION									
SEMINAIRES EN NUTRITION	NUT 7050	OBL.	3,0	A+			H2010	S2010	
SEMINAIRES DE RECHERCHE	NUT 7051	OBL.	3,0	A+			A2010	H2011	
MOYENNE DES COURS REGULIERS			6,0	4,3					
TOTAL DES CREDITS ACQUIS: OBL: 6,0				TOT: 6,0					



FIDE SPLENDET ET SCIENTIA

Université de Montréal
BUREAU DU REGISTRAIRE

PIERRE CHENARD
Registraire

ANNEXE 2 –Montréal 28.06.2015

Briefing du Candidate PhD Daniel Constantin Manolescu.

- 05.2015 - Finaliste Premiers 5% PhD.Cdt. de la Fac.de Médecine pour le Concours National de Recherche en Santé CHRSE, CIHR/IRSC-Posters, Winnipeg Juin.2015. et 2017
- 05.2015- Double Sélection (présentations Orale et Poster) Compétition Lipid Nutrition and Metabolism in Human Health Workshop, Winnipeg 31.May.2015
- 04.2015- Sélectionné (Poster) pour le Canadian Nutrition Society CNS Winnipeg 28.Mai.2015.
- 02.2015 - Sélectionné meilleurs 9 étudiants PhD du Québec en Diabète, Obésité (FRQS/CMDO)
- 3 Bourses PhD CRCHUM (2 Rang/13 cdt -2015, 2 Rang/33 cdt-2012, 1st Rang/45 cdt - 2011)
- J.A. de Sève PhD 2012, excellence PhD 2013-FESP,
- Bourse PhD FRQS/ 1-er rang (2012, 2013)
- Médaille d'Argent Nationale de Recherche IRSC /CHRSE 2012 (first 2%)
- 2 bourses PhD IRSC (Banting et Best 2014 - first 3% et Formation 2013/ 1-er rang).
- Médaille de Diamant de H.M. Queen Elizabeth II/ 2013.
- Diplôme des Nations Unies/Canada pour Volontariat (environnement) 2001.

Jean-Louis Chiasson, M.D.
Endocrinologue, Axe cardiométabolique
☎ 514.890.8000 poste 12732 ; 📠 514.412.7208;
✉ jean.louis.chiasson@umontreal.ca; JLC/sb

Daniel-Constantin Manolescu - PhD Med/Nutrition Cdt.
MSc. Med/Nutrition, BSc.(ing) Sciences et Technologies
Alimentaires / Orientation Physiologie Comparée, Nutrition et
Métabolisme ; CRCHUM, Tour Viger , 08-702, 900 rue St
Denis, H2X 0A9, Montréal, Tel. 514-890-8000#30187 e-
mail: daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Comité FF3 Groupe 8D Programme BF2 Doctorat MANOLESCU, Daniel Constantir https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu	Qualité et intérêt scientifique du projet de recherche						Aptitudes et expérience			
Critères	1	2	3	4	5	Sous-total	6	7	8	Sous-total
Nbre de points total	6	6	6	6	6	30	15	7	8	30
Évaluateurs du dossier:										
Évaluateur A	4,00	4,00	4,00	4,00	5,00	21,00	15,00	7,00	8,00	30,00
Évaluateur B	5,00	4,00	5,00	4,00	5,00	23,00	15,00	4,00	7,00	26,00
Évaluateur C	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	25,00	14,00	7,00	7,00	28,00

Qualité du lieu de formation			Excellence du dossier universitaire		
9	10	Sous-total	11	12	Sous-total
8	7	15	15	10	25
7,00	6,00	13,00	15,00	8,00	23,00
8,00	5,00	13,00	13,00	5,00	18,00
7,00	6,00	13,00	14,00	7,00	21,00
					87,00
					80,00
					87,00

Critères d'évaluation

Qualité et intérêt scientifique du projet de recherche

- 1 Clarté et concision de la problématique de recherche
- 2 Clarté et concordance des hypothèses et objectifs
- 3 Pertinence des méthodes et analyses
- 4 Faisabilité
- 5 Originalité du projet et contribution à l'avancement des connaissances

Aptitudes et expérience

- 6 Publications
- 7 Conférences et présentations
- 8 Participation à des projets de recherche et stages de formation

Qualité du lieu de formation

- 9 Justification du candidat de son choix de lieu de formation
- 10 Qualité du dossier de publications du directeur en lien avec la formation d'étudiants

Excellence du dossier universitaire

- 11 Ensemble du dossier universitaire: cote, progression et maintien
- 12 Bourses, prix et distinctions

Au concours du 15 octobre 2011, 493 demandes de bourses de formation de doctorat ont été soumises à l'évaluation de 23 comités d'experts. Les experts de votre comité d'évaluation ont étudié avec attention les 18 candidatures en compétition. Votre dossier s'est classé au 1^{er} rang et vous avez obtenu une cote scientifique de 84.67 sur 100.

Applicant/Candidat: Monsieur Daniel Constantin MANOLESCU

Faculty/Faculté: Faculté de médecine

Department/Département: Nutrition

**Research Institution/
Établissement de recherche:** Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

**Supervisor(s)/
Directeur(s) de recherche:** Dr. Pangala V. BHAT
Dr. Jean-Louis CHIASSON

Primary Inst./Inst. principal: Nutrition, métabolisme et diabète

**Other Related Institutes/
Autres instituts connexes:** Génétique; Santé publique et des populations; Vieillessement;

Title/Titre: Retinoid (ROL/RA) Impact in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes impact des rétinoides (ROL/RA) dans l'obésité, la résistance à l'insuline et diabète de type 2

Competition Decisions/Décisions relatives au concours

Primary Competition/Concours primaire

Program/Programme: Bourse de recherche au doctorat des IRSC

Decision/Décision: Approuvée Autre offre https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Committee/Comité: Bourses de recherche au doctorat A

Rating/Cote: 4.54

Competition/Concours: 201210MDR

Application Rank Within the Committee/Rang de la demande dans ce comité: 25

Percent Rank Within the Committee/Rang en pourcentage au sein du comité: 2.93%

Category Catégorie	Committee Comité	Total # in competition Total de demandes dans le concours	Total # approved Total de demandes approuvées
Thèmes 1 & 2	Bourses de recherche au doctorat A	852	119
Thèmes 3 & 4	Bourses de recherche au doctorat B	495	73

Additional Funding Opportunities/ Opportunités de financement additionnelles	Decision/ Décision	Competition Code/ Cote de concours	Application Number/ Numéro de la demande
Bourse au doctorat - Bourse d'études supérieures du Canada F. Banting et C. Best	Approuvée	201210GSD	304025

Competition Decisions/Décisions relatives au concours

Primary Competition/Concours primaire

Program/Programme: Bourses de voyage – Appui communautaire des Instituts

Decision/Décision: Approuvée https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Committee/Comité: Institut de la nutrition, du métabolisme et du diabète

Rating/Cote: 4.44

Competition/Concours: 201305ISU

Application Rank Within the Committee/Rang de la demande dans ce comité: 1

Percent Rank Within the Committee/Rang en pourcentage au sein du comité: 9.09%

Category Catégorie	Committee Comité	Total # in competition Total de demandes dans le concours	Total # approved Total de demandes approuvées
Thèmes	Institut de la santé des Autochtones	15	15
Thèmes	Institut du vieillissement	16	16
Thèmes	Institut du cancer	27	15
Thèmes	Institut de la santé des femmes et des hommes	14	12
Thèmes	Initiative de recherche sur la VIH/sida	7	7
Thèmes	Institut du développement et de la santé des enfants et des adolescents	20	15
Thèmes	Institut des services et des politiques de la santé	19	6
Thèmes	Institut de l'appareil locomoteur et de l'arthrite	25	10
Thèmes	Institut de la nutrition, du métabolisme et du diabète	11	8
Thèmes	Institut de la santé publique et des populations	15	8

Application Number / https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu
Name of Applicant / Nom du candidat: MANOLESCU, Daniel Constantin
Review Type / Type d'évaluation: Committee Member 1/Membre de comité 1
Competition: 2012-10-15 CIHR Doctoral Research Award
Concours: 2012-10-15 Bourse de recherche au doctorat des IRSC
Committee: Doctoral Research Awards A
Comité: Bourses de recherche au doctorat A

Assessment / Évaluation:

Achievements and Activities of the Candidate	Raw Score	Max Scores	Multiplier	Weighted Scores
1. Publication Activity	4.8	4.9	0.1	0.48
2. Other Research Activity	4.7	4.9	0.1	0.47
3. Academic Performance	4.5	4.9	0.15	0.68

Characteristics and Abilities of the Candidate	Raw Score	Max Scores	Multiplier	Weighted Scores
4. Reviewer Score	4.4	4.9	0.4	1.76

Research Training Environment	Raw Score	Max Scores	Multiplier	Weighted Scores
5. Training Program for the Candidate	4.5	4.9	0.1	0.45
6. Scientific Activity	4.6	4.9	0.05	0.23
7. Research Resources	4.4	4.9	0.05	0.22
8. Training Record	4.4	4.9	0.05	0.22

	Raw Score	Max Scores		Weighted Scores
Total	36.30	39.2		4.51

Application Number / https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Name of Applicant / Nom du candidat: MANOLESCU, Daniel Constantin

Review Type / Type d'évaluation: Committee Member 2/Membre de comité 2

Competition: 2014-05-26 Travel Awards - Institute Community Support

Concours: 2014-05-26 Bourses de voyage – Appui communautaire des Instituts

Committee: Institute of Nutrition, Metabolism and Diabetes

Comité: Institut de la nutrition, du métabolisme et du diabète

Comments / Commentaires :

Cette demande est très bien rédigée. J'ai beaucoup apprécié la spécificité et la breveté de comment ce financement profitera au candidat. Le candidat démontre d'excellente qualité de recherche, nombreuses bourse et lettre exceptionnelle. Le 'poster' a été au premier rang par la Société canadienne de nutrition, très impressionnant. La demande est très complète et surtout très convaincante, du grand 'grantmanship'.

Application Number / https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Name of Applicant / Nom du candidat: MANOLESCU, Daniel Constantin

Review Type / Type d'évaluation: Committee Member 1/Membre de comité 1

Competition: 2012-10-15 CIHR Doctoral Research Award

Concours: 2012-10-15 Bourse de recherche au doctorat des IRSC

Committee: Doctoral Research Awards A

Comité: Bourses de recherche au doctorat A

Comments:

Dossier exceptionnel. Lettres élogieuses et personnalisées. Milieu de formation de qualité.

FELICITATIONS AUX TITULAIRES DE SUBVENTIONS!

L'INMD félicite les doctorants et les boursiers postdoctoraux ayant reçu une bourse de voyage dans le cadre du concours de mai 2013 du PACI:

Chercheur principal	Établissement	Titre du projet
Daniel Manolescu	Université de Montréal	Vitamin A (at-RA) lowers glycaemia and influence retinoid, energy and insulin metabolism in diabetic mice (Ob/Ob)
Jacquelyn Gragg	Université de la Colombie-Britannique	Type 2 Diabetes and spinal cord injury: results from a national population health survey
Sébastien Labbé	Institut universitaire de cardiologie et pneumologie de Québec	Weight Loss Associated with Bariatric Surgery Was Not Coupled to an Enhanced Activity of Brown Adipose Tissue Capacity and Metabolism in Rodents
Kelly Mulder	Université de la Colombie-Britannique	High variability in DHA status occurs in young children and is not explained simply by low intakes of fish or DHA.
Aurelia Sima	Centre hospitalier de l'Université de Montréal	Aspects préventifs et métabolisme des rétinoïdes dans le syndrome métabolique et le diabète de type 2
Véronique St-Onge	Université Carleton	The Role of Ghrelin in Reinstatement of Food Seeking
Ahmed Abdelmoneim	Université de l'Alberta	Glyburide, In Contrast To Glidazide, Has A Dose-Response Relationship With Adverse Cardiovascular Outcomes In Type 2 Diabetes Patients
Mathieu Maltais	Université de Sherbrooke	Weight-loss induced changes in RMR: Association with leptin and adiponectin levels

Nom, prénom: MANOLESCU DANIEL-CONSTANTIN		Date d'inscription: Janvier 2010	
Programme d'études: <input type="checkbox"/> Microprogramme; <input type="checkbox"/> D.É.S.S.; <input type="checkbox"/> M.Sc. avec travail dirigé; <input type="checkbox"/> M.Sc. avec mémoire; <input checked="" type="checkbox"/> Ph. D.			
Nombre total de crédits requis: 60 académiques + 84 thèse = 90		Nombre total de crédits acquis: 6	
Nombre de trimestres à compléter: min. 6 - max. 15 (T. Plein)		Nombre de trimestres complétés: 7	Nombre de trimestres suspendus: 3
Directeur de recherche, s'il y a lieu: Dr. Angela V. Bhat-PhD			
Codirecteur de recherche, s'il y a lieu: Dr. Jean-Louis Chiasson-MD, PhD			
Membres du comité de thèse, s'il y a lieu: Dr. Olivier Receveur + (à compléter)			
Sujet de recherche, s'il y a lieu:			
Enregistrement du sujet de recherche: <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non : date prévue d'enregistrement: Fait le 21. Fev. 2011			
Maîtrise de la littérature anglaise*: <input checked="" type="checkbox"/> Oui; <input type="checkbox"/> Non → Le directeur doit s'assurer que l'étudiant suit des cours d'anglais			

Partie 1: L'étudiant remplit la section (a) du formulaire de cette page; le directeur complète la (b).

(a)	
Nom, prénom: Daniel-Constantin MANOLESCU	
Date d'inscription: Janvier 2010	
Programme d'études: <input type="checkbox"/> M.Sc. avec stage; <input type="checkbox"/> M.Sc. avec travail dirigé; <input type="checkbox"/> M.Sc. avec mémoire; <input checked="" type="checkbox"/> Ph. D.	
Nombre total de crédits requis: 60 académiques + 84 thèse = 90	
Nombre total de crédits acquis: 6 académiques	
Nombre de trimestres à compléter: min. 6 - max. 15 (T. Plein)	
Nombre de trimestres complétés: 10	
Nombre de trimestres suspendus: 3	
Directeur de recherche: Dr. Jean-Louis Chiasson-MD, PhD	
Codirecteur de recherche, s'il y a lieu:	
Membres du comité de thèse, s'il y a lieu: Dr. Olivier Receveur + (à compléter)	
Sujet de recherche:	
Enregistrement du sujet de recherche: <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non : date prévue d'enregistrement: Fait le 21. Fev. 2011	
Compréhension de la littérature scientifique anglaise: <input type="checkbox"/> Oui; <input type="checkbox"/> Non → Le directeur doit s'assurer que l'étudiant suit des cours d'anglais	

Ce compte-rendu doit être déposé au dossier de l'étudiant, après signature par le directeur du programme ou le responsable du comité de parrainage. **(DOCUMENTATION GLOBAL, COTES DES EVALUATEURS)**

	CRITÈRES	APPRÉCIATION	A	B	C	D	E	C.I.H.R.
1	Connaissance du sujet	3	3	3.0	3.0	3	3	3
2	Connaissances scientifiques connexes	2.7	2	2.5	3.0	3	3	3
4	Capacité à formuler des hypothèses	3	3	3.0	3.0	3	3	3
5	Progression du projet	2.7	2	2.5	3.0	3	3	3
6	Cohérence du projet	3	3	3.0	3.0	3	3	3
7	Capacité de synthèse	2.66	2	2.0	3.0	3	2.8	3
8	Esprit critique	3	3	3.0	3.0	3	3	3
9	Présentations orales	3	3	3.0	3.0	3	3	3

Directeur de recherche: **P.V. Bhat** / ou de programme: **J.L. Chiasson**
 Membre du comité de parrainage: **O. Receveur** / Membre du comité de parrainage: **C. Bibeau**
 Étudiant: **D. Manolescu**
 DATE: **15 décembre 2012**
 Dans ce document, la forme masculine désigne à la fois femmes et hommes
 (Responsable Comité Parrainage)

Appréciation:

NA : non applicable
 0 : problématique
 1 : faible
 2 : bien
 3 : très bien

Le 12 août 2013

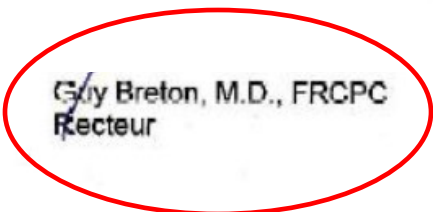
Monsieur Daniel-Constantin Manolescu

Monsieur,

J'ai appris avec grand plaisir que vous aviez été sélectionné pour représenter le Québec au Congrès ICAN (Institute of Cardiometabolism And Nutrition) en décembre prochain.

Permettez-moi, en mon nom et celui de tous les membres de notre communauté universitaire, de vous féliciter pour cette reconnaissance et de vous présenter tous nos vœux de succès. Je tiens également à vous remercier, vivement, pour votre engagement qui contribue au rayonnement international de notre alma mater et à sa réputation d'excellence.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, l'expression de mes sentiments distingués.


Guy Breton, M.D., FRCPC
Recteur

Le 7 mars 2013

M. Daniel-Constantin Manolescu

Monsieur Manolescu,

Au nom de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal, je tiens à vous féliciter chaleureusement pour l'obtention récente de la Médaille du jubilé de diamant de la reine Élisabeth II.

Ce prix vient souligner toute la force de votre engagement et votre désir de participer à construire un monde meilleur. Sachez qu'à la Faculté de médecine, nous partageons entièrement ces valeurs et nous encourageons ces initiatives qui font la différence.

Comme institution d'enseignement et de recherche, nous ne pouvons que nous réjouir de voir nos étudiants s'illustrer ainsi au côté de la crème des étudiants de la province. Pour nous, il ne fait nul doute que l'avenir s'annonce des plus prometteurs pour vous et que vous continuerez d'être un digne représentant de l'Université de Montréal et un véritable vecteur de changement social.

Je vous prie donc d'accepter, Monsieur Manolescu, toutes mes félicitations et l'expression de mes meilleurs sentiments.

Hélène Boïsjoly, M.D., MPH
Doyenne
Faculté de médecine

De : Joyal Marylène
Envoyé : 1 mars 2017 14:14
À : Manolescu Daniel-Constantin
Cc : Chiasson Jean Louis; Mader Sylvie
Objet : FECRS / CSHRF 2017 - Inscription avant le 15 mars 2017

Bonjour monsieur Manolescu,

Il nous fait plaisir de vous informer que vous faites partie des (5) étudiants qui ont été recommandés par la Faculté de médecine pour participer à la 30^e édition du Forum des étudiants canadiens en recherche en santé (FECRS) qui se tiendra du 6 au 9 juin 2017, à Winnipeg. Nous vous souhaitons bon succès pour les prochaines étapes de sélection.

Cordialement, *pour*

Daniel Lajeunesse, Ph.D.
Vice-doyen aux sciences fondamentales

Tony Leroux, Ph.D.
Vice-doyen aux sciences de la santé



March 31, 2017

Canadian Nutrition Society/Société canadienne de nutrition

1867 La Chapelle Street
Ottawa, ON K1C 6A8

Telephone: 613-482-8020 • Toll Free: 1-888-414-7188
Email: info@cns-scn.ca • Website: cns-scn.ca

Dear Mr. Manolescu,

I am delighted to inform you that your abstract entitled « *Positive impact of retinoid (vitamin a / retinoic acid) in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes* » was selected as one of the eight finalists for an Oral Presentation in the Canadian Nutrition Society (CNS) Nutrition Graduate Student and Trainee Competition, being held during the 2017 CNS Annual Conference taking place in Montreal, Quebec. The competition was of very high caliber this year with 180 abstracts submitted. The judges had a significant task to select the finalists. You should be very proud of the effort that you put forward in preparing a high quality abstract.


CNS Abstract and Awards Co-Chair

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

ATTRIBUTION



Faculté des
études supérieures
et postdoctorales

Université 
de Montréal

Le 17 octobre 2012

Monsieur Manolescu,

C'est avec plaisir que nous vous remettons la Bourse J.A. DeSève d'une valeur de 6000 \$. Cette récompense témoigne de l'excellence de votre dossier universitaire et représente un encouragement à la poursuite de votre cheminement universitaire.

Le montant de cette bourse est ajouté à votre chèque que vous recevrez lors de la cérémonie de votre département.

Nous vous prions d'accepter nos meilleurs vœux de succès et de réussite.

Roch Chouinard,
Doyen et vice-recteur adjoint aux études supérieures

Le 21 novembre 2017

M Daniel-Constantin Manolescu
204-111, de la Barre
Longueuil QC
J4K 2T8

Objet : Octroi d'une bourse d'excellence et de rayonnement de la FESP - Département de nutrition de la Faculté de médecine

Cher Monsieur,

J'ai le plaisir de vous annoncer que le Comité des études supérieures du Département de Nutrition a recommandé votre candidature à une Bourse de rayonnement de la Faculté des études supérieures et postdoctorales et à une bourse d'excellence du fonds de dotation du Département de nutrition de la Faculté de médecine.

Le Département vous octroie la somme de 3745.69 \$.

Mme Lizon Desgagnés entrera en contact avec vous prochainement pour que cette bourse puisse vous être remise rapidement.

Je vous félicite au nom de tout le Département et vous souhaite plein succès dans votre démarche.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, mes salutations distinguées



Jacques Gresset Ph.D.
Professeur émérite
Administrateur adjoint assurant les fonctions
de directeur de Département

Camp d'hiver 2015 du Réseau CMDO

Les 9 candidats québécois sélectionnés

Université McGill et Centre de recherche du CHU Ste-Justine :

- VAN HULST, Andréa (Post-doctorat en épidémiologie et biostatistique, PARADIS, Gilles et HENDERSON, Mélanie)

Faculté de Médecine de l'Université de Montréal et CRCHUM:

- MANOLESCU, Daniel-Constantin (Doctorat en nutrition, CHIASSEON, Jean-Louis)
- MOULLE, Valentine (Post-doctorat physiologie animale, POITOUT, Vincent)
- SIMA, Aurélie (Doctorat en nutrition, CHIASSEON, Jean-Louis)

Faculté de médecine et de la santé de l'Université de Sherbrooke (FMSSUS) et du Centre de recherche du CHUS (CRCHUS):

- BLONDIN, Denis (Post-doctorat en physiologie, CARPENTIER, André)
- HOUDE, Andrée-Anne (Doctorat en biochimie, BOUCHARD, Luigi)
- SIRARD, Stéphanie (Doctorat en sciences cliniques, LANGLOIS, Marie-France et VALQUETTE, Louis)

Centre de recherche du CHU de Québec – CHUL :

- DA SILVA, Marine (Doctorat en kinésiologie, RUDKOWSKA, Iwona)

Institut de la nutrition et des aliments fonctionnels (INAF) :

- ALLAM-NDOUL, Benedicte (Doctorat en nutrition, VOHL, Marie-Claude)

Vous avez été sélectionnés parmi les meilleur(e)s étudiant(e)s du Québec et nous espérons que ce passage au Camp d'hiver 2015 contribuera à faire de vous non seulement des scientifiques de haut niveau mais également des ambassadeurs québécois de la recherche sur la santé cardiométabolique, le diabète et l'obésité.

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

Bon Camp d'hiver 2015!

André Carpentier, M.D.

Directeur du Réseau de recherche CMDO du FRQS





June 14, 2012

Daniel-Constantin Manolescu
Université de Montréal

Dear Daniel-Constantin:

Please accept my congratulations on your winning an award of excellence (Silver category) in the Canadian Institutes of Health Research National Research Poster competition, June 13, 2012.

I should note that it is the identification of the Canadian Institutes of Health Research with the presentation of excellent health research by trainees, the generosity and far-sightedness of the CIHR that have made this award possible.

CIHR National Health Research Poster Presentation

E. A. Kroeger, Ph.D.
Assistant Dean, Graduate Studies
Coordinator, Canadian Student Health Research Forum



Edwin A. Kroeger, Ph.D.
Coordinator, CSHRF 2012
June 13, 2012

A.) ARTICLES, LIVRES, COMMUNICATION ET RÉSUMÉS PUBLIÉS AVEC COMITÉ DE LECTURE

- 1) Oct.2014: Article - «Effects of Retinoic Acid (RA) on the expression of Retinoid Homeostatic genes in diabetic mice (ob/ob)» - Manolescu DC, et al, - in progress now – info Dr.Jean-Louis Chiasson
- 2) Mai.2014- Article «All-trans Retinoic Acid stimulates Cardio-protective hormones and prevents Cardiac Fibrosis and Apoptosis in Diabetic Mice(ob/ob) », Manolescu DC, Jankowski M, PVBhat, Chiasson JL, Gutkowska Y e.a. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism* 10.1139/apnm-2014-0005.-publié. Imp. impact médiatique: 100 reprises de presse internationale ensuite.
- 3)Dec.2013: Résumé scientifique «Impacts and therapeutic potential of retinoid (vitamin A/RA) in obesity and type 2 diabetes», Manolescu Daniel-C et al – Annales Institut Cardiométabolique et Nutrition, ICAN Paris, France
- 4)Oct.2013 : Résumé scientifique « Impacts and Therapeutic Potential of Retinoid (RA) in Obesity and Type 2 Diabetes. A Nutrigenomic Approach » - J.Nutrigen et Nutrigenomics, Oct. 2013;6:201-255; No.64/pag.233
- 5)Août.2013-Book«Vitamin Binding Proteins-Functional Consequences/Ch.II-RBP4 in Obesity & insulin resistance»-Manolescu DC/Bhat PV.CRC Press/Taylor and & Francis Group, Canada
- 6)Mai.2013-Résumé Scientifique «Vitamin A (at-RA) lowers glycaemia and influence retinoid, energy and insulin metabolism in diabetic mice»-Manolescu DC et al,NRC Press/App.Physio,Nut&Metabolism 4th CNS,
- 7)Juin.2012-Résumé Scientifique «Vitamin A-Bioactive nutriment. Effects of Retinoic Acid (RA) on diabetic mice»- Manolescu et al, NRC Press/Applied Physiology, Nutrition & Metabolism,Vol.37 No.(3) - 3rd CNS Canada
- 8)Fév.2012-Résumé Scientifique «Effets du traitement avec Acide Rétinoïque sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques»-Manolescu DC, Rev. Diététistes Qc,Vol.9 No.3/22.
- 9)Dec.2011-Article « Retinoid and retinoid metabolic gene expression in mouse adipose tissues»-Sima A, Manolescu DC et al, *Biochemistry and Cell Biology* 89(6):578-584 (2011), NRC Press,Canada
- 10)Juin 2011-Résumé Scientifique « L'Acide Rétinoïque dans le traitement du Diabète T2 »-Manolescu DC, Revue de l'Ordre Professionnel de Diététistes du Québec(OPDQ), Vol. 9, No.1, Canada
- 11)July 2010-Article «A human ALDH1A2 gene variant is associated with increased newborn kidney size and serum retinoic acid»-E.Kares, Manolescu DC et al, *Kidney International*, PMID: 20375987, IF: 6,5 ; USA
- 12)Juin 2010-Article « Newborn serum retinoic acid level is associated with variants of genes in the retinol metabolism pathway»,Manolescu DC et al, *Pediatric Research* PMID: 20308937, IF: 2,7 ; USA
- 13)Fév.2010-Article « All-trans RA lowers serum retinol-binding protein 4 (RBP4) and improves insulin sensitivity in diabetic mice » Manolescu DC et al,140 (2):311 *Journal of Nutrition*. 140 (2):311-16, IF 3,7 ; USA
- 14)Mars 2010-Mémoire MSc« Niveau de Vitamine A (ROL et AR) dans le sang de cordon ombilical et développement rénal de nouveau-nés»- ManolescuDC, Papyrus, Thèses /Université de Montréal
- 15)Aug.2008:Article «Vitamin A in nephron mass & possible relationship to hypertension»-PV.Bhat/Manolescu DC, Vol.138, No.8 *Journal of Nutrition*, IF 3,7 ; USA
- 16)Sep.2001« Avis scientifique-Mortalité massive des Carpes du St-Laurent à l'été 2001»- Environnement Québec et Canada, FAPAQc,BNQ,1-550-38479-2 ISBN, utilisé pour réévaluation centrale nucléaire Gentilly 2

B.) CONGRES, SYMPOSIUMS, ACTES DE COLLOQUES, CONTRIBUTIONS OUVRAGE COLLECTIF

- I) Août.2014 «Vitamin A modulates fat tissue biology improving on obesity and type 2 diabetes »17th World Congress of Food Science and Technology & Expo (IUFOST) organisée par (CFSTI), en Août 17 à 21, 2014 à Montréal
- II) Juin.2014 «Vitamin A (Retinoic Acid) treatment in obese and insulin resistant mice (ob/ob) » Conférence Nationale de l'association Diététistes de Canada (DC), le Juin 12 à 14, 2014 à Ottawa.
- III) Juin.2014 «Natriuretic peptide and other cardio-protective genes are stimulated by vitamin A (retinoic acid), preventing apoptosis and fibrosis in obese-diabetic mice heart» Congrès de la Société Canadienne de Nutrition CNS, Juin 5 à 7, 2014, St. John's, NF
- 1) Fév.2014: Congrès CRDM, «All-trans Retinoic Acid Preserves Cardiac Oxytocin System and Prevents Apoptosis in Diabetic Mice » Manolescu DC et al, Centre Recherche Diabète Montréal /MDRC
- 2) Dec.2013: Congrès 1st-ICAN, «Impacts and therapeutic potential of retinoid (vitamin A/RA) in obesity and type 2 diabetes», Manolescu Daniel-C et al, Inst Cardiométab. Nutrition, (10 winners CMDO/FRQS for Québec)
- 3) Déc.2013: Congrès CRCHUM «Vitamin A treatment, improves on obesity and type 2 diabetes in ob/ob mice», Manolescu DC et al, XVI-Congrès Résidents MD, MSc et PhD CRCHUM, Université de Montréal
- 4) Oct.2013: Congrès SINN «Impacts and therapeutic potential of retinoid (RA) in obesity and type 2 diabetes. A nutrigenomic approach»- Société Internationale de Nutriginomique, Québec, Canada
- 5) Juin 2013 : Congrès CNS «VLA (RA) lowers glycaemia & influence retinoid, energy and insulin metabolism in diabetic mice »-Canadian Nutrition Society, Québec, 6-eme place au Concours affiches Sc.
- 6) Mars 2013: Congrès, affiche « L'influence de la Vitamine A (ROL, RA) sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie du glucose chez des souris diabétiques (Ob/Ob- II) »Manolescu DC et al, SFD Montpellier, France
- 7) Jan.2013: Congrès, Affiche « Vitamin A (ROL, RA) impacts on energy metabolism and glucose homeostasis in diabetic mice (Ob/Ob) » - Manolescu DC et al, Centre Recherche Diabète Montréal.
- 8) Déc. 2012 : Congrès, Affiche« L'influence de la Vitamine A (ROL, RA) sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie du glucose chez des souris diabétiques (Ob/Ob) » - Manolescu DC et al, XV-e CRCHUM,Mtl
- 9) Juin.2012: Compétition CIHR «Role of Vitamin A (ROL) in Glucose homeostasis» - Manolescu DC et al, Forum Canadien des Étudiants Recherche en Santé, Winnipeg MB, June/12-14.12 – Top 5% -Silver Medal
- 10) Mai.2012: Congrès, Affiche « Retinoid in functional foods. Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)» - Manolescu DC et al, CIFST/ICSTA Canadian Institute of Food Science and Technology-50th Conference, Niagara Falls ON, May 27-29- taux selection 30%–

- 11) Mai.2012: Congrès, Affiche «*Vitamin A-Bioactive nutriment. Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)* » - Manolescu DC et al, CNS/SCN Canadian Nutrition Society Annual Meeting, Vancouver BC, May 23-26.2012 – *taux sélection 20%* –
- 12) Mai.2012: Congrès, Affiche «*Impacts métaboliques de l'Acide Rétinoïque (at-RA) dans l'obésité et la résistance à l'insuline chez des souris diabétiques (ob/ob)* » - Manolescu DC et al, Société Qc de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme SQLNM, 13-ème Congrès Annuel, Québec, Mai 10-11- *selected* -
- 13) Fev.2012 : Colloque, Affiche «*Effets du traitement avec Acide Rétinoïque sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)*», Manolescu DC et al, 7e Colloque en Santé Publique de l'Université de Montréal (AEESPUM) Mtl. 21 Fev.2012, - *taux sélection 40 %* –
- 14) Fev.2012: Congrès, Affiche «*Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)* » - Manolescu DC et al 12th McGill Biomedical Graduate (AMBGC), *sélection 30%*-
- 15) Jan.2012 : Congrès, Affiche «*Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)* » - Manolescu DC et al, Retraite Sc. du Centre Recherche Diabète Montréal.
- 16) Déc. 2011 : Congrès, Affiche «*Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)* » - Manolescu DC et al, XIV-e Congrès CRCHUM, Montréal, 2011.
- 17) 10.Nov.2011- Congrès Nutrition Québec (FMOQ) et OPDQ-Affiche «*Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA) sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)*», Manolescu DC, A.Sima, P.V.Bhat, - résumé et affiche proposés et acceptés pour publication OPDQ
- 18) 4. Nov.2011- Jour Recherche Nutrition, Affiche «*Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA) sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)*»-Manolescu DC
- 19) 7.Oct.2011- Symposium AXE Cardio-Métabolique - affiche «*Effects of Retinoic Acid (RA) on the expression of retinoid homeostatic genes in diabetic mice (ob/ob)* » - Manolescu DC, J.L.Chiaison, P.V.Bhat Mtl
- 20) 7.Oct.2011- Symposium AXE Cardio-Métabolique-affiche «*Niveaux sériques de RBP4 et Rétinol dans l'obésité et diabète de type 2 chez l'humain* » - Sima A, Manolescu DC, J.L.Chiaison, P.V.Bhat et al, Montréal
- 21) Juillet 2011: Congrès, affiche «*Retinoic Acid (RA) preserves Cardiac Oxytocin System and inhibits Apoptosis in Diabetic Mice* » - Jankowski M, Manolescu DC, BhatPV, Gutkowska J et al. 2011, 9th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH 2011), Boston, USA, Juillet 27-30, 2011
- 22) Avril 6-9.2011: Congrès, affiche «*Effects of Retinoic Acid (RA) on the expression of retinoid homeostatic genes in diabetic mice (ob/ob)* » - PVBhat, Manolescu DC et al, 4th Int Prediabetes Metabolic Syndrome, Spain,
- 23) Mars 2011: Symposium, affiche «*All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and improves insulin sensitivity in diabetic mice* » - Manolescu DC et al, Mois de la Nutrition, - *Les données probantes*- de l'Ordre Professionnel de Diététistes du Québec (OPDQ), Montréal 10.Mars.2011.
- 24) Jan.2011 : Congrès, affiche «*Implication du système Ocytocine-Acide Rétinoïque dans la protection antiapoptotique cardiaque de souris diabétiques (ob/ob)*»- Plante E, Manolescu DC et al, S.Q. d'Hyp. Artérielle
- 25) Déc. 2010 : Congrès, affiche «*Effets du traitement avec Acide Rétinoïque sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)*», Manolescu DC et al, XIII-e CRCHUM.
- 26) Déc. 2009 : Congrès, affiche «*All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and improves insulin sensitivity in diabetic mice* » - Manolescu DC et al, XII-e Congrès Sc. CRCHUM.
- 27) Mars 2009 : Affiche «*Polymorphisme du gène ALDH1A2 (RALDH2-Rétinal Déshydrogénase de Type2) et taux d'Acide Rétinoïque dans le sang de cordon ombilical* » - Manolescu DC et al, XI-e Congrès CRCHUM
- 28) Déc. 2007 : Congrès, affiche «*Niveaux foetaux de VtA dans le sang de cordon ombilical et volume rénal de nouveau-nés* » - Manolescu DC et al, X-e Congrès Scientifique du CRCHUM, Montréal, Déc. 2007

C.) PRÉSENTATIONS, ALLOCUTIONS/CONFÉRENCE, TABLES RONDES, FORMATION CONTINUE.

- 1) Mai.2012-13-14 : Assistant Resp. Scientifique, NUT3035 *Journée Recherche Bacc Nutrition*, 02.05.2013
- 2) Mars.2013: Formation continue «*Éthique dans la recherche biomédicale* »-Mise à jour-FRQS et MSSS Qc
- 3) Mai.2012 : Assistant Resp. Scientifique, NUT3035 *Journée Recherche Bacc Nutrition*, 03.05.2012
- 4) Jan-Mai 2012: Formation continue «*Raisonnement Clinique/Pédagogie appliquée à la santé* »-CPASS, Udm
- 5) Mar.22.2012 : Formation continue «*La Sécurité Alimentaire* » Can Institut Food Science&Tech- Qc. ICSTA
- 6) Nov-Déc.2011: Formation continue «*Diabète /Clinique/Pédagogie appliquée à la santé* »-CPASS, Udm
- 7) Oct.2011: Formation continue «*Implications nutritionnelles du traitement de l'obésité* »-NUT/ U.de Mtl
- 8) Oct.2011: Form. Clinique «*Dépistage/évaluation: Troubles Conduite Alimentaire* »-Cln.Psychoalimentaire,Mtl
- 9) Mai/Sep. 2011: Affiche Dép. Nutrition «*Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA) sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)* » - DC Manolescu et al, 2011
- 10) Mai.2011 : Assistant Resp. Scientifique, NUT3035 *Journée Recherche Bacc Nutrition*, 05.05.11
- 11) Avril 2011 : Table Ronde- «*Écologie et Nutrition - Composants technologiques dans l'offre alimentaire* » - coordonateur Daniel Constantin Manolescu, NUT 7051, Méd./Nutrition, U de Montréal 13.04.11
- 12) Mars 2011 : Conférence - «*Préparation d'une affiche scientifique* » - Dr. Bémour C. et Manolescu DC Séminaires recherche PhD et MSc, NUT 7051 et NUT6650, Dép. Nutrition/Médecine, U de M, 23.03.2011
- 13) Mars 2011 : Conférence «*L'Acide Rétinoïque dans le traitement du Diabète de Type 2* » - Manolescu DC, Séminaires recherche PhD et MSc NUT7051/6650, Dép. Méd. /Nutrition, U de Montréal, 09.03.2011
- 14) Fév.2011 : Analyse d'article II «*Lifestyle impact in T2DM hepatic steatosis*»-Dr.I.Strvchar, Manolescu DC

- 15) Jan.2011 : Analyse d'article I - « *Hepatic steatosis in adults with T2DM* »-Dr.J.C.Lavoie, Manolescu DC
- 16) Mai/Sép. 2010: Affiche Sc. Dép. Nutrition/Médecine, UdeM : « *All-trans retinoic acid lowers serum retinol binding protein 4 (RBP4) levels and improves insulin sensitivity in diabetic mice* », Manolescu DC et al, 2010
- 17) Mai 2010: Conférence « *Niveaux foetaux de VitA dans le sang de cordon ombilical et volume rénal de nouveau-nés* » - Daniel-Constantin Manolescu, NUT 7050, Dép. Nutrition/Médecine, U de M.
- 18) 13. Avr. 2010 : Conférencier invité « *L'Acide Rétinoïque (RA) dans le traitement du Diabète de Type 2* » - DC Manolescu, invité par Laboratoire Diabète et fibrose kystique du Dr.Y. Bérthiaume CRCHUM Montréal
- 19) 17. Mars.2010: Table Ronde-«*Les pro-biotiques et leurs bio-associés, une approche de santé préventive et thérapeutique complémentaire valable ?* » coordonateur Manolescu DC, NUT 7050, Dép. Nutrition, U de Mtl.
- 20) Mai/Sept 2009: Affiches Dép. Nutrition, UdeM : «*Polymorphisme du gène ALDH1A2 (RALDH2-Rétinal Déshydrogénase de Type2) et taux d'Acide Rétinoïque dans le sang de cordon ombilical* », Manolescu DC
- 21) Mai /Sept 2008 : Affiches Sc. dans le Dép. Nutrition/Médecine, UdeM : « *Niveaux foetaux de VitA dans le sang de cordon ombilical et volume rénal de nouveau-nés* » - Daniel Constantin Manolescu et al.
- 22) Mai-2008 : Conférence, Journée de la Recherche des Étudiants en Baccalauréat, Dép. Nutrition, UdeM, « *Niveaux foetaux de VitA dans le sang de cordon ombilical et volume rénal de nouveau-nés* » - Manolescu DC

D.) MENTIONS, RAYONNEMENT, MEMBRE DE SOCIÉTÉS SCIENTIFIQUES

- 1) Juin-Août.2014 : 80 reprises de presse internationale pour mes publications sur la Vit.A et le Métabolisme Énergétique.
- 1) Octobre 2013 : Reçu membre de la International Nutrigenomics Society, SINN/ ISNN
- 2) Mai.2013: Reçu Premiers 3%-Rang et l'octroi CIHR-Bourse PhD F. Banting & C.Best (for 2014,2015)
- 3) Mars.2013 : Mentions de presse : Synapse, Nouvelles U de Montreal, Quartier-Libre, Info-CRCHUM
- 4.) Fev.2013 Médaille Diamant HMQ Reine Élisabeth II, 2012-13 Reconnaissance Prof et Sociale
- 5.) Oct.2012 : Sélectionné CRCHUM (14 PhD. Cdt)-Table Ronde avec le Prix Nobel/1998 Dr. F. Murad 6.)
- Juin.2012: Médaille d'Argent Nationale /Compétition Recherche IRSC/CHRSF/Winnipeg, 12-14.06.12 7.) Mai.2012: Reçu Premier I-Rang et l'octroi de FRSQ d'une Bourse Doctorale PhD (2012-2013-2014) 8.)Mai.2012:Membre of Dieteticians of Canada (DC-No 102707)
- 9.)Mai-Juin.2012: Mention Bulletin CR-CHUM Info CRCHUM – Vol.6 No.3 et No.4
- 10.) Avr.2012: Sélection Excellence Top 5% sur 696 étudiants PhD –Faculté de Médecine- U de Montréal
- 11) Avr.12: Mention « remarquables réalisations scientifiques+ grand leadership » Concours Vanier 2010-11-12
- 12) Mars.2012: Sélectionné par FESP/UdeM pour Bourse Mackenzie King/(No.1/15 et 2/34 candidatures)
- 13) Mars.2012: Mention Bulletin CR-CHUM Info CRCHUM – Vol.6 No.2
- 14) Fev.2012: Reçu membre de la Société Québécoise de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme SQLNM.
- 15) Jan.2012: Mention d'excellence, Bulletin CR-CHUM Info CRCHUM - Volume 6, numéro 1
- 16) Dec.2011: Reçu membre du Centre de Recherche du Diabète de Montréal- CRDM/MDRC
- 17) Dec.2011: Reçu le Premier I-Rang (sur 45 candidats PhD)/ Bourse PhD Complt.de CRCHUM Montréal
- 18) Oct.2011: Reçu membre du Canadian Institut of Food Science and Technology. – CIFSC/ICSTA
- 19) Mai 2011 : Mention « excellent dossier académique et scientifique » - 4ème-rang, Comités FRSQ 2010-11
- 20) Mai 2011 : Mention « excellent dossier académique et scientifique (4.4 sur 4.9) »Comités IRSC/HR 2010-11
- 21) Octobre 2010 : Reçu membre de la Canadian Nutrition Society (invitation reçue en Mars 2010)CNS/SCN
- 22) Octobre.2010: Mention/Bulletin Centre de Recherche InfoCRCHUM 8 OCT 2010 – Vol 4, Nr 10
- 23) Février 2010 : Mention dans le Bulletin – *Les Brèves du Centre de Recherche CHUM*, Vol.1, Nr.1
- 24) Jan. 2010: Mention excellence, Almanach scientifique « *LEAD DISCOVERY* » - Great Britain
- 25) Jan.2010 : Mention d'excellence, Bulletin Centre de Recherche CHUM *InfoCRCHUM*, Vol.4, Nr.1
- 26) Déc.09-Jan.2010: Acceptation unanime du Mémoire de Maîtrise coté «*premiers 10%*» par le Jury
- 27) Février 2009 : Mention dans le Bulletin de la Faculté de Médecine, UdeM, Vol. 6, Nr.1
- 28) Janvier 2009 : Mention /Bulletin Centre de Recherche CHUM *InfoExpress*, Vol 3, Nr.1
- 29) Octobre 2008 : Mention dans le Bulletin de la Faculté de Médecine, UdeM, Vol.5, Nr.5
- 30) August 2008 : Mention/Bulletin Centre de Recherche CHUM *InfoExpress*, Vol 2, Nr.8
- 31) Oct.2001 «*Volunteer of Year 2001-L'Année Internationale des Bénévoles*» (ONU, Rés.52/17 du 20.XI.97),
- 32) Oct.2001:Membre projet International « *PADI AWARE*» pour écologie et protection de la biologie marine

ENSEIGNEMENT : 2006- 2014 : À la Fac.Médecine/Nutrition et Fac.Education Permanente : 15 contrats majeurs (Assistant d'enseignement, Responsable Scientifique, Aide Pédagogique, TP, Correcteur, Moniteur, Démonstrateur labo, Auxiliaire TP), plus de 50 surveillances et plusieurs implications bénévoles. . SUPERVISION : Dec.2011-Deux étudiants PhD, ateliers analyse rétinoides (extraction et HPLC spécifique), Mai 2011 : Formation d'une stagiaire MSc (operating HPLC).

(voir plus de détails dans la Lettre de Motivation)

https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu
clix

Bourse Excellence Rayonnement NUT/Univ.Montréal	3745 \$ / Nov.2017	Forfataire	Reçu
Bourse Excellence Rayonnement NUT/Univ.Montréal	2000 \$ / Nov. 2016	Forfataire	Reçu
ACADEMIC AWARDS - BOURSES PRIX ET DISTINCTIONS		Daniel-Constantin Manolescu Cdt. PhD.	
ORGANISME SUBVENTIONNAIRE	MONTANT / ANNÉE	TYPE	STATUT
Bourse Defi-CRCHUM Présentation Congres	350\$ / Sept 2014	Remboursement	REÇU
Bourse CRDM/MDRC Présentation Congres	700 \$ / Août.2014	Remboursement	REÇU
Prix Remb Retro Congres 2013 NUT /Univ de Montréal Qc.	1000\$/ Fev. 2014	Remboursement	REÇU
Prix.Congrès Cardio Metabolique /1st ICAN Paris FR	700\$/ Dec.2013	Remboursement	REÇU
Prix.Congrès Nutrigénomique / SINN International Qc.	2000\$/ Dec.2013	Remboursement	REÇU
Prix Université de Sherbrooke Québec /1st ICAN Paris	500\$/ Dec.2013	Remboursement	REÇU
Prix CMDQ/FRQS/ ICAN Paris (10 winners for Québec)	2500\$/Dec.2013	Remboursement	REÇU
Prix Complement PhD NUT/FESP /Univ de Montréal	500\$/ Nov.2013	Forfataire	REÇU
Bourse Congres NUT/FESP /Université de Montréal Qc.	1000\$/ Nov.2013	Forfataire	REÇU
Prix Excellence PhD.FESP Open Univ.de Montréal 2013	5000\$/2013.Novembre	Forfataire	REÇU
Société Internationale de Nutrigénomique	Membre Octobre 2013	Reconnaissance	Académique
Bourse Formation IRSC/CIHR (Rang 1-er Nut /Canada)	1500 \$/2013.VII	Forfataire	REÇU
Congrès SCN/CNS Nutrition-Qc (6-ème place) / Eli Lilly	2000\$/2013.VI	Remboursement	Confirmée
Bourse PhD F.Banting&C.Best CIHR (Rang First 3%)	30.000\$/ par année	2014 et 2015	Confirmée
Brse.Congrès Soc.Frs.Diabète-France / Novo Nordisk	1000\$/2013.III	Remboursement	REÇU
Médaille Diamant HMQ Reine Élisabeth II, 2012-13	Reconnaissance	Contribution	Prof et Sociale
Prix Excellence PhD CRCHUM (2ème Rang/33 dossiers)	1000\$/2012.XII	FORFAITAIRE	REÇU
Prix Excellence PhD. Automne Nut/FESP/U de Mtl	1000\$/ 2012.X	FORFAITAIRE	REÇU
J.A. de Sève Excellence PhD-FESP/U de Mtl. 2012	6000\$/2012.IX	FORFAITAIRE	REÇU
Silver Medal CIHR/CHRSF-Canada, (Rang First 2%)	250\$/2012.VI	FORFAITAIRE	REÇU
Bourse Congrès CHRSF-Fac. Médecine /U de Montréal	700\$/2012.VI	Remboursement	Confirmée
Bourse Congrès-Centre Recherche Diabète Mtl - MDRC	700\$/2012.VI	Remboursement	Confirmée
Bourse Congrès Formation – Défi/CRCHUM	700\$/2012.V	Remboursement	Confirmée
Dietitians of Canada - DC	Membre Mai.2012	Reconnaissance	Académique
Sélection Top 5% sur 696 étudiants PhD Fac. Médecine	Avr.2012	Reconnaissance	Excellence
Bourse PhD FRSQ (Rang 1-er/groupe) Québec	20.000\$/ par année	2012 et 2013	REÇU
Prix Excellence PhD, Spring Nutrition/ Univ.de Montréal	3000\$/2012.IV	FORFAITAIRE	REÇU
Soc. Qc. Lipidologie, Nut& Métabolisme SQLNM	Membre Fev.2012	Reconnaissance	Académique
Bourse Découverte PhD, C. Rech.Diabète Mtl-MDRC	8000\$/2011.XII	FORFAITAIRE	REÇU
Prix Complt. PhD CRCHUM (1-er Rang/45 dossiers)	1000\$/2011.XII	FORFAITAIRE	REÇU
Centre Rech. DiabèteMontréal- CRDM/MDRC	Membre Dec.2011	Reconnaissance	Académique
Bourse Excellence PhD. Automne Nut/FESP/U de Mtl	5000\$/2011.XI	FORFAITAIRE	REÇU
Canadian Inst. of Food Science & Technology - CIFSC	Membre Oct.2011	Reconnaissance	Professionnelle
Prix Excellence PhD. Printemps Nut/FESP/U de Mtl	2000\$/ 2011.IV	FORFAITAIRE	REÇU
Prix Complt Excellence PhD CRCHUM	2000\$/2010.XII	FORFAITAIRE	REÇU
Bourse Excellence PhD. Automne Nut/FESP/U de Mtl	5000\$/ 2010.XII	FORFAITAIRE	REÇU
Canadian Nutrition Society – CNS /SCN	Membre Oct.2010	Reconnaissance	Académique
FAECUM Excellence PhD-FESP/U de Mtl. 2010	2500\$/2010.IX	FORFAITAIRE	REÇU
Bourse Excellence Recherche, Nutrition/ U de Mtl.	5000\$/ 2009-2010	FORFAITAIRE	REÇU
Liste du Doyen Faculté de Médecine – Graduation MSC	2010 Reconnaissance	Excellence	Académique
Prix Excellence MSc. CRCHUM	2000\$/ 2008.XII	FORFAITAIRE	REÇU
Prix Excellence MSc. Automne Nut/FESP/U de Mtl	1000\$/2008.XI	FORFAITAIRE	REÇU
BOURSE MSC./CIHR-Bhat/CRCHUM, U de Montréal	17.850 \$ / Année	2007	2009 REÇU
Diplôme «Volunteer of Year » (ONU, Rés.52/17 20.11.97)	2001 Reconnaissance	Implication sociale	et Bénévolat

Le 14, Décembre, 2016

Objet: M. Daniel-Constantin Manolescu - Ph.D. Cdt. Nutrition/Médecine, Université de Montréal

Recommandation pour: **Bourse Postdoctorale 2017 / 2018.**

Monsieur, Madame,

M. Daniel-Constantin Manolescu a obtenu son diplôme d'ingénieur en chimie et technologie des aliments (équivalent du baccalauréat en génie alimentaire, avec spécialisation en ressources alimentaires d'origine aquatique) à l'Université de Galati en Roumanie. Il a poursuivi avec ses études en recherche sur la physiologie comparée des vertébrés, notamment physiologie de la nutrition et de la reproduction chez les poissons, à Paris. Il a ensuite obtenu sa maîtrise en nutrition à l'Université de Montréal en 2010, sous la direction du Dr. Pangala V. Bhat au CRCHUM. Il est actuellement inscrit au Doctorat en nutrition à l'Université de Montréal sous ma direction et co-direction de Dr. Sylvie Mader de IRIC. Il est un exemple de persévérance car natif de Roumanie, il a dû s'exiler d'abord en France, puis à Montréal pour continuer ses études tout en travaillant. Il est organisé et productif et il a très bien réussi sa Maîtrise en Nutrition avec 2 publications ce qui lui a valu l'inscription sur la liste d'honneur du doyen de la Faculté de Médecine à titre d'étudiant exceptionnel.

Monsieur Manolescu s'est notamment démarqué par son enthousiasme, son intelligence, ses idées novateurs, et sa productivité scientifiques. Il a 6 publications à son actif dans des revues avec comité de pairs. L'excellence de son travail lui a valu plus de vingt-sept bourses et prix d'excellence dont la bourse J.-A. De Séve Ph.D. 2012, trois bourses d'excellence Ph.D. CRCHUM, une bourse Ph.D. du FRQS s'étant classé premier dans sa catégorie, une médaille d'argent canadienne 2012 des IRSC et une bourse au Ph.D. des IRSC où il s'est classé dans les premiers 3 %. Il a reçu la Médaille du Jubilé de Diamant de Sa Majesté la Reine Elizabeth II en 2013 pour ses contributions à la société canadienne. Il a été sélectionné pour faire partie des 10 représentants du Québec (FRQS/CMDO) au Congrès ICAN à Paris en 2013. En Juin 2014, il s'est classé premier dans la sélection préliminaire de toutes les communications scientifiques du congrès de la Société Canadienne de Nutrition, à St. John, Newfoundland, et sa présentation a fait l'objet de plus de 80 notes de presse internationales. En plus, il a présenté ses travaux à deux autres congrès l'un national et l'autre international en 2014, soit la Conférence Nationale de l'Association des Diététistes du Canada en juin 2014 à Ottawa et le 17th World Congress of Food Science and Technology & Expo organisé par la Canadian Food Science and Technology Institute en août 2014 à Montréal. Il a également été classé dans les 5% premiers Ph.D.-Cdt de la Faculté de Médecine en 02.2015. Il a progressé donc très bien dans son programme Ph.D. Une bourse postdoctorale l'aidera poursuivre sa formation scientifique, si brillamment commencée.

Monsieur Daniel C. Manolescu est également un excellent communicateur. Depuis 2006 à ce jour il a rempli régulièrement des contrats de soutien à l'enseignement au Département de nutrition de la Faculté de médecine et à la Faculté d'éducation permanente de l'Université de Montréal. Ainsi il fut apprécié comme auxiliaire d'enseignement, aide pédagogique, responsable scientifique, superviseur en formations techniques de chromatographie HPLC, surveillant d'examen, correcteur, moniteur, démonstrateur de laboratoire, auxiliaire de travaux pratiques et conférencier. Il a aussi complété la formation du programme de Pédagogie du CPASS de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal. Il a également complété la formation en éthique pour les recherches scientifiques en sciences biologiques et biomédicales de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal et du Ministère de la santé et services sociaux du Québec. Nous avons donc pu apprécier son éloquence et sa clarté dans le transfert de l'information.

Nous considérons qu'il possède les ingrédients nécessaires pour contribuer à l'enseignement et à la recherche universitaire. C'est donc avec beaucoup d'enthousiasme que je recommande Monsieur Daniel Manolescu pour une bourse postdoctorale 2017 / 2018.

Jean-Louis Chiasson, M.D.

Endocrinologue, Axe cardiométabolique

☎ 514.890.8000 poste 12732 ; 📠 514.412.7208;

✉ jean.louis.chiasson@umontreal.ca; JLC/sb



*S. Mader, Ph.D.
Professor
Institute for Research in Immunology and Cancer
Faculty of Medicine
C.P. 6128, succursale Centre Ville
Montréal, PQ H3C 3J7
Tel : (514) 343-7166
Fax: (514) 343-7383
E-mail: sylvie.mader@umontreal.ca*

Le 14. Décembre.2016

Objet: M. Daniel-Constantin Manolescu - Ph.D.Cdt. Nutrition/Médecine, Université de Montréal
Recommandation pour: Bourse Postdoctorale 2017 / 2018

Ayant agi comme co-directrice de recherche de Daniel Manolescu à sa demande depuis Janvier 2016 dû au départ à la retraite du Dr Bhat, un de mes collaborateurs de longue date, il me fait plaisir d'écrire cette lettre de support pour son application pour une bourse de rédaction du Département de Nutrition. Daniel a maintenu une moyenne parfaite de 4.3 pendant son doctorat et s'est impliqué activement dans l'enseignement et le mentorat. Il a été très productif en termes de participation à des congrès et publications (une quinzaine d'abstracts, 6 publications indexées dans PubMed). Cette productivité a été reconnue par plusieurs bourses de support pendant son Ph.D., dont deux bourses extrêmement compétitives provenant des IRSC. Plusieurs publications additionnelles sont en cours de rédaction.

Daniel a développé essentiellement de manière indépendante un programme de recherche original et très prometteur sur l'impact de la biosynthèse de l'acide rétinolique dans l'obésité et le diabète. Ses publications dans le domaine ont été accueillies de manière très favorables, tel qu'attesté par les citations de ses articles et les prix obtenus lors de ses présentations scientifiques. Il se destine à la recherche et à l'enseignement et a toutes les compétences nécessaires en termes de curiosité scientifique, sens critique et persistance face à l'adversité.

Meilleures salutations,

Sylvie Mader, Ph.D.
Professor
Department of Biochemistry
Institute for research in immunology and cancer (IRIC)
CIBC Research Chair in Breast Cancer



Leadership and social implication background for the candidate
Daniel Constantin Manolescu PhD. student
Département Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Montréal

Daniel Constantin Manolescu is a candidate who was twice in an immigrant position (1990 France and 1994 Canada) and in both he succeeded brilliantly his integration into new countries socio-economical structures and a rich participation in social, professional and academics lives, overwhelming all challenges he may faced in those journeys. This is a proof of his communication talents, adaptative skills, creativity and leadership. He is a trilingual, polyvalent and adaptative person and he successfully took lead and initiative in various fields as professional, NPO and volunteer. First, he successfully travelled and studied in several countries (Romania, France, Canada, USA) in biology & nutrition related fields. He regularly was and is (2006 to now) active in University of Montréal, Medicine/NUTRITION Department academic life as teacher assistant, lab demonstrator, corrector & exam supervisor and member of various students committees (promoting research on first cycle, welcoming new graduate students, etc.). He's also deeply involved (volunteering, NPO, professional) in Environmental causes since 1995 and therefore he received an official civic recognition as the **Canadian 2001-Volunteer of the Year-DIPLOMA** (UN-statement!) from H. Pierre S Pettigrew –Minister of Foreign Economic Relations and Development, primarily for his determinant involvement (ichthyopathology expertise) with Environment Québec and Canada in 2001 St.-Lawrence fish viral epizooty. His partnership with the Environmental NPO-Heritage Laurentian for Sustainable development is also remarkable. He is also promoting people health education through his biomedical nutrition skills and his official qualifications as private fitness coach (Énergie Cardio ant Ataraxia Diploma 2006), first respondent help (Croix Rouge, Ambulance St-Jean, and Aqua-rescue), etc. He is also registered member of Certified Coaches Federation of Canada and of Canadian Nutrition Society. He proved financial entrepreneurship talent by funding (1996) his private equities and bonds investment group (4 investors) which he still successfully manage (Canadian Banking Institute Diploma 2001). On cultural axes he is professionally active (member of the ACTRA-Canadian Actors Union) in cinema field (casting, silent-character, doubling) since 2001 and he also published several literary creations of himself (translations, poetry, philosophy). He also contributed to the sponsorship (Agora Romagna Latina prizes) of an international Romanian poetry contest (Starpress 2008 and 2010). On the knowledge and information-transfer axes he was active (since 1994, France, Canada) on promoting book and written media (distribution, publishing help to young writers, etc.), as education-animation team supervisor (Science Center of Montréal), scientifically vulgarization articles (several magazines in Montréal) and he still volunteering in citizen-journalism as press-editor correspondent (certified license) for a Romanian-Canadian web-magazine (Starpress Valcea Turism). We can also mention various civic implications and regularly integration help for new European migrants in Canada.

Montréal, 07.Jan.2013

Dr. Pangala V. Bhat, Ph.D.
Professor, Medicine and Nutrition
Chief, Laboratory of Nutrition and Cancer 7-124
CRCHUM, Hôtel-Dieu, 3840, Saint Urbain Street,
Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada
Tel (514) 890-8000 Ext. 12927, Fax: (514) 412-7152
Email: Pangala.V.Bhat@umontreal.ca

CENTRE HOSPITALIER DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

HÔTEL-DIEU (Siège social)
3840, rue Saint-Urbain
Montréal (Québec)
H2W 1T8

HÔPITAL NOTRE-DAME
1560, rue Sherbrooke Est
Montréal (Québec)
H2L 4M1

HÔPITAL SAINT-LUC
1058, rue Saint-Denis
Montréal (Québec)
H3X 3J4

To whom it may concern,

Montreal, January 29, 2013

I have known Mr. Daniel Manolescu since he joined the next door laboratory of Dr. Pangala Bhat at the CHUM Research Center in 2006. I have quickly noticed his unusual dedication to the work and determination. I could see him on a regular basis working in the lab during after-hours and on the weekends. I also found him as a very open person. I have frequent discussion with him when he was writing his recent manuscripts or preparing posters for upcoming scientific meetings. From these discussions I found Daniel as a very knowledgeable, mature person, with clear ideas and willing to pursue challenging projects. He is not only hard working but also very productive student able to critically discuss and evaluate his own experiments. I know that in a relatively short time he has contributed to several papers and conference presentations. He has received several well-deserved awards of excellence from CIHR, the CHUM Research Center, as well as prizes from the Nutrition Department and the Montreal Diabetes Center.

In summary, Mr. Manolescu is an excellent student that every laboratory director would strive to have on his team.

Ryszard Grygorczyk, Ph.D.
Professor
Department of Medicine, University of Montreal
Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)
3850 St. Urbain St., Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8
Phone: (514) 890-8000 ext. 15089
Email: ryszard.grygorczyk@umontreal.ca



CENTRE DE RECHERCHE DU CENTRE HÔPITALIER DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

■ Hôpital-Dieu
3850, rue Saint-Urbain
Montréal (Québec) H2W 1T7

■ Hôpital Notre-Dame
2099, rue Alexandre-de-Sève
Montréal (Québec) H2L 2W5

■ Hôpital Saint-Luc
264, boul. René-Lévesque Est
Montréal (Québec) H2X 1P1

■ Technopôle Angus
2901, rue Rachel Est
Montréal (Québec) H1W 4A4



Université de Montréal

Faculté de médecine

Attendu que le Conseil de la Faculté atteste que

Daniel-Constantin Manolescu

a terminé les études du programme de deuxième cycle en
nutrition

Nous, Recteur,

par décision du Conseil de l'Université et en vertu de Notre autorité, lui conférons la

Maîtrise ès sciences (M. Sc.)

à compter du 4 mars 2010 avec tous les droits, honneurs et privilèges qui s'y rattachent.

En foi de quoi Nous signons ce document muni du grand sceau de l'Université
ainsi que de la signature de la secrétaire générale et de celles du doyen et de la secrétaire de la Faculté.

Fait à Montréal, le 12 avril 2010

Le doyen

[Signature]

Le recteur

[Signature]

La secrétaire

La secrétaire générale

[Signature]



https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu

HONNEUR DU DOYEN

Décerné à

Monsieur Daniel Manolescu

*Au nom du doyen et des membres du Conseil de la Faculté de médecine, permettez-moi de vous offrir nos plus sincères félicitations pour le succès que vous avez obtenu au cours de vos études de maîtrise. Nous sommes heureux de vous inscrire sur la liste **d'Honneur du doyen** à titre d'étudiant exceptionnel.*

Nous vous souhaitons une carrière fructueuse, qui saura répondre à vos aspirations.

*Chantal Lambert, B.Pharm., Ph.D.
Secrétaire de la Faculté*

14 juin 2010

Université 
de Montréal



IDENTIFICATION DU CANDIDAT

Formulaire 2014-2015

Nom	Manolescu	Prénom(s)	Daniel-Constantin	No de demande	
Sexe	Mme <input type="radio"/>	M <input checked="" type="radio"/>		MANDA	
				NIP	

ADRESSE

Numéro civique/Rue	Centre Recherche - CRCHUM	Extrait de contributions. Pour plus de détails consulter https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Manolescu
	Tour Viger Labo R08.702	
	Université de Montréal-Recherche	
	900, rue Saint-Denis	
Ville	Montréal	
Province/État	Québec	
Pays	Canada	
Code postal	H2X 0A9	
Téléphone		
Bureau	(514) 890-8000	Poste 30187
Courriel	daniel-constantin.manolescu@umontreal.ca	

ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT OU DE RECHERCHE DU CANDIDAT

Etablissement	U. de Montréal
Département s'il y a lieu	Médecine/Nutrition

NOM ET PRÉNOM DES CO-AUTEURS DE L'ÉQUIPE ET PRINCIPAUX COLLABORATEURS

Sima	Aurelia	PhD
Bhat	Pangala V	PhD
Chiasson	Jean-Louis	MD
Mader	Sylvie	PhD
Gutkowska	Yolanta	PhD
Jankowski	Marek	PhD
Broderick	Tom L.	PhD

NOTES BIOGRAPHIQUES

Cheminement académique, deux expériences de carrière ou de recherche les plus pertinentes au cours des deux dernières années

MSc. (liste Doyen-2010, UdeM) / médaille argent CIHR 2012/Bourse FRSQ PhD (rang I) 2011-12/Bourse J.A. de Séve 2012/Médaille Diamant Reine Elizabeth II 2013/Lauréat FRQS/CMDO/ICAN 2013 France/Lauréat Canadian Nutrition Society 2014

NIVEAU DE FORMATION ACTUEL

Collégial <input checked="" type="radio"/>	Baccalauréat <input checked="" type="radio"/>	Maîtrise <input checked="" type="radio"/>	Doctorat <input checked="" type="radio"/>	Post-doctorat <input type="radio"/>	Autre (précisez) <input checked="" type="radio"/> Pedagogy Certifications
--	---	---	---	-------------------------------------	---

Site web

Profil

Disciplines étudiées

	Discipline étudiée
1	Biologie cellulaire
2	Biologie et autres sciences connexes
3	Diététique et nutrition
4	Endocrinologie
5	Nutrition
6	Physiologie

Disciplines de recherche

	Discipline de recherche
1	Biologie cellulaire
2	Biologie moléculaire
3	Diététique et nutrition
4	Endocrinologie
5	Physiologie

Sujets de recherche

	Sujet de recherche
1	Désordres endocriniens
2	Désordres métaboliques
3	Désordres nutritionnels
4	Diabète
5	Métabolisme énergétique
6	Nutrition
7	Obésité

Champs d'application

	Champ d'application
1	Évolution et traitement des maladies
2	Fondements biomédicaux de la santé humaine
3	Santé publique

Mots-clés des spécialisations de recherche

	Mots-clés des spécialisations de recherche
1	1-Nutrition et Métabolisme
2	2- Vitamine A et Retinoïdes
3	3-Diabète et Obésité
4	4-Biochimie Alimentaire
5	5-Biologie Moléculaire
6	6-Génétique / Nutrigénomique
7	7-Physiologie Comparée
8	8-Nutrition et Activité Physique
9	9-Ecotoxicologie / Ecologie Alimentaire
10	HPLC / RTqPCR / WB / Spectrométrie

Formation

Diplômes

1	PhD. MSc. BSc (Ing), Pedagogy, Medical Ethics, Coaching and Fitness Certifications
---	--

	Titre de la présentation	Nom de conférence ou d'événement	Lieu	Ville	Public principal	Étiez-vous conférencier invité?	Date de la présentation	Co-présentateurs
1	"Vitamin A (at-RA) lowers glycaemia and influence retinoid, energy and insulin metabolism in diabetic mice (Ob/Ob)" Manolescu DC et al, Affiche	Canadian Nutrition Society, Congrès 30.V – 02.VI.13 Québec, Canada	Canada / Québec	Québec	Chercheur	Oui	2013-05-31	
3	« Vitamin A (ROL, RA) impacts on energy metabolism and glucose homeostasis in diabetic mice (Ob/Ob) » -Affiche Manolescu DC et al,	Retraite Scientifique 2013 du Centre de Recherche Diabète Montréal MDRC	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2013-01-21	
4	« L'influence de la Vitamine A (ROL, RA) sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie du glucose chez des souris diabétiques (Ob/Ob) »-Affiche Manolescu DC et al	XV-ème Congrès annuel des résidents et étudiants gradués de CRCHUM, Université de Montréal	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2012-12-14	
5	«Role of Vitamin A (ROL) in Glucose homeostasis» - Affiche Compétition CHRSE/CIHR 2012 Silver Medal Winner	CHRSE/CIHR 2012 - Forum Canadien des Étudiants Recherche en Santé, Winnipeg MB, June/12-14.2012 - Selection rate 2%	Canada / Manitoba	Winnipeg	Chercheur		2012-06-13	
6	« Retinoid in functional foods. Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)»-Affiche	CIFST/ICSTA Canadian Institute of Food Science and Technology-50th Conference, Niagara Falls ON, May 27-29.2012, Selection rate 30%	Canada / Ontario	Niagara-Falls	Chercheur		2012-05-28	
7	«Vitamin A-Bioactive nutriment. Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)»-Affiche	Congrès Scientifique, CNS/SCN Canadian Nutrition Society Annual Meeting, Vancouver BC, May 23-26.2012, Selection Rate 10%	Canada / Colombie-Britannique	Vancouver	Chercheur		2012-05-24	
8	«Impacts métaboliques de l'Acide Rétinoïque (at-RA) dans l'obésité et la résistance à l'insuline chez des souris diabétiques (ob/ob) »-Affiche	13-ème Congrès Annuel SQLNM/Société Qc de Lipidologie, Nutrition et Métabolisme, Québec, Mai 10-11.2012 - Selection rate 20%	Canada / Québec	Québec	Chercheur		2012-05-11	
9	«Effets du traitement avec Acide Rétinoïque sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)-III»-Affiche	7e Colloque en Santé Publique de l'Université de Montréal (AÉESPUM) Mtl. 21 Fev.2012, Sélection rate 40%	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2012-02-21	
10	«Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)- III »-	12th McGill Biomedical Graduate (AMGBC), Feb.16th, Mtl.2012, Selection Rate 30%	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2012-02-16	

	Affiche							
11	« Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)-II »-Affiche	Retraite Scientifique CRDM/MDRC-Centre Recherche Diabète Montréal, Jan.2012	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2012-01-21	
12	«Metabolic and biomolecular effects of Retinoic Acid (RA) treatment on diabetic mice (ob/ob)-I »-Affiche	XIV-e Congrès Scientifique CRCHUM, Montréal, Dec.2011	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2011-12-17	
13	«Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA) sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)-II»-Résumé/correspondance	Congrès NUTRITION Québec 2011/FMOQ-Fédération Médecins Omnipraticiens et OPDQ -Ordre Professionnel Dietétistes Québec.	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2011-11-10	Résumé et affiche proposés par correspondance et acceptés pour publication par OPDQ- Ordre Professionnel Dietétistes Québec
14	«Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA) sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)- I »-Affiche	Jour Recherche Nutrition Etudes Supérieures-Fac.Médecine/Nutrition, Université de Montréal	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2011-11-04	
15	« Effects of Retinoic Acid (RA) on the expression of retinoid homeostatic genes in diabetic mice (ob/ob)-II» - Affiche	Symposium AXE Cardio-Métabolique - Centre Recherche Universitaire CHUM Montréal	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2011-10-07	
16	«Retinoic Acid (RA) preserves Cardiac Oxytocin System and inhibits Apoptosis in Diabetic Mice»-Affiche	9th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH 2011), Boston, USA,	États-Unis / Massachusetts	Boston	Chercheur		2011-07-28	Jankowski M, Manolescu DC, BhatPV, Gutkowska J et al.
17	«Écologie et Nutrition - Composants technologiques dans l'offre alimentaire » - Table Ronde	Conférence Écologie et Nutrition - Séminaires de Recherche NUT7051 et NUT6650 Études Supérieures/Faculté de Médecine/Nutrition, Université de Montréal	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2011-04-13	Manolescu DC, Sima A, Azandjeme CS, El- Rahi B et al. Coordonateur Manolescu DC
18	«Effects of Retinoic Acid (RA) on the expression of retinoid homeostatic genes in diabetic mice (ob/ob)-I»-Affiche	4th International Congress on Prediabetes and Metabolic Syndrome, Spain	Espagne	Madrid	Chercheur		2011-04-08	Bhat PV, Manolescu DC, Sima A
19	« Préparation d'une affiche scientifique » - Conférence	Ateliers Conférences - Méthodologie dans la Recherche Scientifique - Séminaires Recherche NUT7051/NUT6650-Études Supérieures/Fac.	Canada / Québec	Montréal	Preneur de décision		2011-03-23	Manolescu DC et Bémeur C.

		Médecine/Nutrition Univ.Montreal						
20	«All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and improves insulin sensitivity in diabetic mice» - Affiche	Symposium Mois de la Nutrition 2011- Les données probantes- Congrès de Ordre Professionnel Diététistes du Québec (OPDQ)	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2011-03-10	
21	« L'Acide Rétinoïque dans le traitement du Diabète de Type 2 »- Conférence	Conférences PhD-Séminaires Recherche NUT7051/NUT665 0-Études Supérieures/Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2011-03-09	
22	« Lifestyle impact in T2DM hepatic steatosis » - Méthodologie/Analyse d'article II	Ateliers Conférences - Pédagogie dans la Recherche Scientifique - Séminaires Recherche NUT7051/NUT665 0-Études Supérieures/Fac.M édecine/Nutrition, U niv.Montreal	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2011-02-09	Manolescu DC, Strychar I
23	« Hepatic steatosis in adults with T2DM » - Méthodologie/Analyse d'article I	Ateliers Conférences - Pédagogie dans la Recherche Scientifique - Séminaires Recherche NUT7051/NUT665 0-Études Supérieures/Fac.M édecine/Nutrition, U niv.Montreal	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2011-01-26	Manolescu DC, Strychar I, Lavoie JC
24	« Implication du système Ocytocine-Acide Rétinoïque dans la protection antiapoptotique cardiaque de souris diabétiques (ob/ob)»-Affiche	Congrès 2011 Société Québécoise d'Hypertension Artérielle	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2011-01-21	Plante E, Manolescu DC, Danalache BA, Jankowski M, Gutkowska J et al.
25	«Effets du traitement avec Acide Rétinoïque sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob)»-Affiche	XIII-e Congrès Scientifique CRCHUM, Montréal, Dec.2010	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2010-12-15	
26	«Niveaux foetaux de Vitamine A dans le sang de cordon ombilical et volume rénal de nouveau-nés»- Conférence	Conférences PhD-Séminaires Recherche NUT7051/NUT665 0-Études Supérieures/Fac.M édecine/Nutrition, Université de Montréal	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2010-05-11	
27	« L'Acide Rétinoïque (RA) dans le traitement du Diabète de Type 2 » - Conférence	Conférencier Invité à la Journée de présentations interdisciplinaires - Diabète et fibrose kystique du Dr.Y. Berthiaume CRCHUM Montréal	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2010-04-13	
28	«Les pro-biotiques et leurs bio-associés, une approche de santé	Conférence Santé et Nutrition - Séminaires de Recherche	Canada / Québec	Montréal	Utilisateurs de connaissances		2010-03-17	Manolescu DC, Sima A, Azandejeme CS, El- Rahi B et

	préventive et thérapeutique complémentaire valable ? »-Table Ronde	NUT7051 et NUT6650 Études Supérieures/Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal						al. Coordonateur Manolescu DC
29	«All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and improves insulin sensitivity in diabetic mice»-Affiche	XII-e Congrès Scientifique CRCHUM, Montréal, Dec.2009	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2009-12-18	
30	«Polymorphisme du gène ALDH1A2 (RALDH2-Rétinal Déshydrogénase de Type2) et taux d'Acide Rétinoïque dans le sang de cordon ombilical»-Affiche	XI-e Congrès Scientifique CRCHUM, Montréal, Mars.2009	Canada / Québec	Montréal	Chercheur		2009-03-12	

Entrevues et relations avec les médias

Entrevues publiées

	Sujet	Tribune	Date de publication
1	Ouvrir l'intérêt de jeunes écoliers pour la recherche scientifique-Le parcours scolaire préparatoire.	Romanian Global News - International Press Agency (on-line)	2012-10-11
2	Le recherche scientifique dans une carrière académique	« ACCENT Montréal » - Journal écrit (web et papier)/Presse locale Montréal, An.4/No.96/pag.4	2012-09-28

Publications

Articles PubMed

	Identifiant PubMed	Titre	Revue	Volume	Numéro	Date de publication	Auteurs
1	PMID: 22077479	Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues.	Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire	89	6	2011-12-01	Sima A , Manolescu DC , Bhat P
2	PMID: 20375987	A human ALDH1A2 gene variant is associated with increased newborn kidney size and serum retinoic acid.	Kidney international	78	1	2010-07-01	El Kares R , Manolescu DC , Lakhal-Chaieb L , Montpetit A , Zhang Z , Bhat PV , Goodyer P
3	PMID: 20308937	Newborn serum retinoic acid level is associated with variants of genes in the retinol metabolism pathway.	Pediatric research	67	6	2010-06-01	Manolescu DC , El-Kares R , Lakhal-Chaieb L , Montpetit A , Bhat PV , Goodyer P
4	PMID: 20032483	All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice.	The Journal of nutrition	140	2	2010-02-01	Manolescu DC , Sima A , Bhat PV
5	PMID: 18641182	Role of vitamin A in determining nephron mass and possible relationship to hypertension.	The Journal of nutrition	138	8	2008-08-01	Bhat PV , Manolescu DC

Articles de revue

	Titre de l'article	Auteurs	Revue	Volume	Statut de publication	Date	Revu par un comité de lecture?	Rôle	Nombre de collaborateurs	Numéro	Rangée de page
1	"Vitamin A (at-RA) lowers	Manolescu DC, Sima A, Pangala	Applied Physiology, Nutrition, and	Juin.2013	Article publié	2013/6	Oui	Auteur principal	3		

	glycaemia and influence retinoid, energy and insulin metabolism in diabetic mice (Ob/Ob)*	V.Bhat et Jean-Louis Chiasson	Metabolism / NRC Press - 4e réunion scientifique annuelle de la Société Canadienne de Nutrition CNS, Québec QC, 30.V - 02.VI.2013								
2	« Metabolic and biomolecular effects of retinoic acid treatment on diabetic mice (ob/ob) » - Résumé scientifique - (as an application for Vitamine A -Bioactive nutriment)	Manolescu DC, Sima A, Bhat PV	Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism / NRC Press - 3e réunion scientifique annuelle de la Société canadienne de nutrition CNS, Vancouver BC, May 23-26.2012	Vol.37	Article publié	2012/6	Oui	Auteur principal	2	No(3)	583
3	« Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA) sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob) » - Communication Scientifique	Manolescu Daniel-Constantin	« NUTRITION - Science en Évolution » - Revue de l'Ordre Professionnel de Diététistes du Québec(OPD Q)/Hiver 2012	Vol.9	Article publié	2012/2	Oui	Auteur principal	1	No.3	pag.22
4	« L'Acide Rétinoïque dans le traitement du Diabète de Type 2 » - communication scientifique	Manolescu Daniel-Constantin	« NUTRITION - Science en Évolution » - Revue de l'Ordre Professionnel de Diététistes du Québec(OPD Q)/Printemps 2011	Vol.9	Article publié	2011/6	Oui	Auteur principal	1	No.1	pag.27

Chapitres de livre

	Titre du chapitre	Titre du livre	Auteurs	Statut de publication	Date	Éditeur	Le livre a-t-il été revu par un comité de lecture?	Rôle
1	« Retinol Binding Protein-RBP4 in obesity and insulin resistance »	« Vitamin Binding Proteins – Their Functional Consequences »	Manolescu DC. and Bhat PV	Article publié	2012/12	CRC Press/Taylor & Francis Group	Oui	Coauteur

Thèses

	Titre de la thèse	Organisation	Superviseur	Date complétée
1	Mémoire de Maîtrise- « Niveau de Vitamine A (ROL et AR) dans le sang de cordon ombilical et développement rénal de nouveau-nés » - D.C. Manolescu, Bibliothèque Papyrus 03.2010/Thèses et Mémoires/Université de Montréal	Université de Montréal	Dr.PV Bhat PhD	2009-08-31

Documents de travail

	Titre du document	Auteurs	Date complétée
1	«Effets du traitement avec Acide Rétinoïque (RA)	Manolescu DC, Sima A, Bhat PV	2011-09-01

	sur les rétinoïdes et l'expression des gènes de leur métabolisme chez des souris diabétiques (ob/ob) - Affiche murale 01.05.11 à 01.09.2011 -Dépt.Nutrition Université de Montréal		
2	« All-trans retinoic acid lowers serum retinol binding protein 4 (RBP4) levels and improves insulin sensitivity in diabetic mice »- Affiche murale 01.05.10 à 01.09.2010 -Dépt.Nutrition Université de Montréal	Manolescu DC, Sima A, Bhat PV	2010-09-01
3	« Polymorphisme du gène ALDH1A2 (RALDH2-Rétinal Deshydrogénase de Type2) et taux d'Acide Rétinoïque dans le sang de cordon ombilical » - Affiche murale 01.05.09 à 01.09.2009 -Dépt.Nutrition Université de Montréal	Manolescu DC, Sima A, Bhat PV	2009-09-01
4	« Niveaux foetaux de Vit.A dans le sang de cordon ombilical et volume rénal de nouveau-nés » - Affiche murale 01.05.08 à 01.09.2008 -Dépt.Nutrition Université de Montréal	Manolescu DC, Sima A, Bhat PV	2008-09-01

Propriété intellectuelle

Divulgations

	Titre de la divulgation	Statut de la divulgation	Date de dépôt	Date de délivrance
1	Expertise Ichtyo-pathologie/« Avis scientifique sur la Mortalité massive des Carpes dans Saint-Laurent/Été 2001 »-FAPA Québec, Environnement Québec/Canada – Mingelbier M, Manolescu DC et al. BNQ ISBN 1-550-38479-2	Divulgation protégée	2001-08-01	2001-10-25

Perspectives 1: Projets de recherche fondamentale sur l'AR dans l'obésité et le diabète. 364

a) « *Diet, food supplements, RA and intestinal microflora in obesity and diabetes* »- by Daniel-Constantin Manolescu and Aurelia Sima, 2017, correspondent Manolescu DC 364

b) « *Mitochondrial dynamics profiles and RA in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes* », by Daniel-Constantin Manolescu, 2017 correspondent Manolescu DC..... 364

c) « *Sirtuins and RA in obesity, insulin resistance, type 2 diabetes and age-related metabolism* » -by Daniel-Constantin Manolescu, 2017 correspondent Manolescu DC 364

Perspectives 2 : Projet vétérinaire et préclinique associé à l'AR, obésité et diabète..... 381

« *Optimising RA efficacy against obesity and insulin resistance in mice* »..... 381

by Daniel-Constantin Manolescu, BSc.(ing)², MSc.¹ PhD.Cdt.¹ - correspondent 381

Perspectives 3 : Projets cliniques humains impliquant l'AR dans l'obésité et le diabète 389

« *Le potentiel de l'acide rétinoïque dans la prévention et le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 chez l'humain* »-Manolescu DC et Sima A. ; Bhat PV. et Chiasson J.L..... 389

Perspectives 4 : Projets cliniques humains impliquant l'AR dans l'obésité et le diabète 405

« *Assessing RA efficacy against obesity and insulin resistance in humans* »..... 405

by Daniel-Constantin Manolescu and Pangala V Bhat , correspondent Daniel-Constantin Manolescu 405

« *Metabolomics nutritional data, mirrors of health and disease in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. What place for retinoids ?* » correpondent Manolescu DC..... 421

QUEEN ELIZABETH II
DIAMOND JUBILEE MEDAL



MÉDAILLE DU JUBILÉ DE DIAMANT
DE LA REINE ELIZABETH II

Daniel-Constantin Manolescu

*By Command of Her Majesty The Queen,
the Diamond Jubilee Medal is presented to you
in commemoration of the sixtieth anniversary
of Her Majesty's Accession to the Throne
and in recognition of your contributions to Canada.*

*Par ordre de Sa Majesté la Reine,
la Médaille du jubilé de diamant vous est présentée
en commémoration du soixantième anniversaire
de l'accession de Sa Majesté au Trône et en reconnaissance
de votre contribution au service du Canada.*

Gouverneur général du Canada manuscrit signature


Governor General of Canada

Gouverneur général du Canada

1952 - 2012





Completed Thesis Copyright ***Daniel Constantin Manolescu*** 2018

25. XII. MMXVII AD